



Ingénierie, photophysique et fonctionnalisation de chromophores pour la bio-photonique non linéaire in-vivo

Bastien Mettra

► To cite this version:

Bastien Mettra. Ingénierie, photophysique et fonctionnalisation de chromophores pour la bio-photonique non linéaire in-vivo. Chimie organique. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2015. Français. <NNT : 2015ENSL1038>. <tel-01247127>

HAL Id: tel-01247127

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01247127>

Submitted on 4 Jan 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lyon, délivré par l'École Normale Supérieure de Lyon

Discipline : chimie

Laboratoire de Chimie de l'ENS de Lyon

École Doctorale de Chimie de Lyon

présentée et soutenue publiquement le 19 Novembre 2015

par Monsieur **METTRA Bastien**

Ingénierie, photophysique et fonctionnalisation de chromophores pour la bio-photonique non-linéaire *in vivo*

Directeur de thèse : Mme. Chantal ANDRAUD

Co-encadrant de thèse : M. Cyrille MONNEREAU

Après l'avis de :

M. Frédéric BOLZE

M. Jean-Olivier DURAND

Devant la commission d'examen formée de :

M. Frédéric BOLZE, Maître de conférences université de Strasbourg

Rapporteur

M. Jean-Olivier DURAND, Directeur de recherche université de Montpellier

Rapporteur

M. Frédéric FAGES, Professeur, université Aix-Marseille III

Examineur

M. Michel SLIWA, Chargé de recherche université de Lille

Examineur

M. Jérôme FORTAGE, Chargé de recherche université de Grenoble

Membre invité

M. Boudewijn VAN DER SANDEN, chercheur INSERM Clnatec Grenoble

Membre invité

M. Cyrille MONNEREAU, Maître de conférences ENS de Lyon

Co-encadrant de thèse

M^{me}. Chantal ANDRAUD, Directeur de recherche CNRS

Directrice de thèse

Remerciements

Dans un tout premier temps je souhaite remercier Chantal ANDRAUD et Cyrille MONNEREAU pour m'avoir permis d'intégrer l'équipe chimie pour l'optique au sein de l'ENS de LYON. Je leur remercie pour la confiance et pour la liberté qu'ils m'ont données pour mes travaux de recherche. Les thèmes de recherche sur lesquels j'ai été amené à travailler m'ont passionné. Je souhaite aussi souligner le temps qu'il m'a été laissé pour pouvoir m'impliquer dans les nombreux enseignements que j'ai effectué au cours de cette thèse.

Dans un deuxième temps, je tiens à remercier les membres du jury. Messieurs Jean-Olivier DURAND et Frédéric BOLZE d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail et pour les critiques qu'ils ont fait de mon travail. Je remercie aussi Michel SLIWA et Frédéric FAGES d'avoir accepté d'être examinateur de ce travail. Je remercie Jérôme FORTAGE, membre invité qui avec Tanguy LE BAHERS a suivi l'avancement de mes travaux de thèse au cours de ces quatre ans. Enfin je remercie Boudewijn VAN DER SANDEN de venir représenter dans ce jury les collaborations qui furent nombreuses et enrichissantes.

Il est maintenant temps de citer les collaborateurs dont les travaux font partie intégrante de cette thèse. La première avec la docteur Odrun Arna GEDERAAS (Department of Cancer Research and Molecular Medicine, NTNU Trondheim) et le professeur Mikael LINDGREN (Department of Physics, NTNU Trondheim), spécialistes en photothérapie des cancers et en biophysique. Dans le cadre de cette collaboration, j'ai pu réaliser un séjour de 20 jours à l'université de Trondheim, au cours duquel des expériences d'imagerie cellulaire ont été effectuées. Je les remercie de leur accueil. Je souhaite aussi remercier Monica Kløvstad SIKSJØ, étudiante de Master avec qui les expériences ont été commencées et qui les a terminées dans le cadre de son Master. Une seconde collaboration a été mise en place avec la docteur Katarzyna MATCZYSZYN (Institute of physical

Remerciements

and theoretical chemistry, Wrocław University of Technology) et le professeur Marek SAMOĆ (Institute of physical and theoretical chemistry, Wrocław University of Technology) dont le groupe a étudié les propriétés d'association entre les sondes polymères synthétisées et l'ADN et a aussi réalisé les mesures de sections efficaces à deux photons par Z-scan. Un grand merci à Marco DEIANA pour avoir réalisé toutes ces manipulations. La troisième collaboration avec Florence APPAIX et Boudewijn VAN DER SANDEN pour tout le travail d'imagerie intravitale qui a permis de faire de belles images de vascularisation sanguine dans le cerveau des souris, Boudewijn VAN DER SANDEN, encore pour les nouveaux projets sur le suivi d'angiogenèse et les premiers résultats prometteurs. La quatrième, aux collaborations « maison » avec Tangui LE BAHERS qui a bien voulu accepter de modéliser toutes ces grosses molécules qui demandent du temps de calcul...et Yuan-Yuan LIAO, Patrice BALDECK, Guillaume MICOVIN et Noël LASCOUX pour les mesures de section efficace et les expériences de microscopie à deux photons. Les manipulations de photochromes et d'initiateur de polymérisation d'ADN bien que non décrites dans cette thèse ont occupé une partie du temps de recherche.

Je veux aussi dire merci à l'équipe technique du laboratoire de Chimie : Jean-Christophe et Delphine pour avoir refait des molécules et pour la mise au point pour les poly-bromés les plus récalcitrants, Sandrine pour les analyses RMN sur les mêmes composés dont les carbones ont souvent joué à cache-cache et Christian pour les différents ordinateurs que j'ai eus entre mes mains et qui n'ont pas toujours été très coopératifs avec moi.

Mes remerciements vont aussi aux membres de l'équipe *chimie pour l'optique*, Yann, Olivier, François et leurs étudiants pour les réunions d'équipe.

Il est temps de remercier tous ceux qui font la vie du laboratoire, les discussions de couloirs, les séances sport et les discussions sur les enseignements et les étudiants. Laure-Lise, Bastien, Aline, Sandrine, Dawei et Jean-Christophe qui tour à tour ont été mes co-bureau. J-C, Laure, Delphine, Alexandre, Marc-Alexandre pour la course à pied et le badminton.

Si cette thèse a duré quatre ans, c'est à cause ou plutôt grâce à ce poste d'AGPR qui a permis de faire un grand nombre d'enseignements. Ce fut un plaisir de travailler dans de bonnes conditions avec les étudiants et les collègues d'enseignements. Je tiens en particulier à citer ici les étudiants que j'ai pu encadrer en stage de recherche : Alicia, Lena, Coralie et Simon et l'équipe techniques d'enseignements Sandrine, Elodie, Emmanuelle,...et surtout les AGPR Martin, Raymond, Maëlle et Laure-Lise qui me supportent depuis notre entrée à l'ENS en 2007.

Remerciements

Merci également à tous les autres membres du laboratoire de Chimie et du département Sciences de la Matière avec qui j'ai travaillé ou que j'ai pu croiser pendant ces huit ans à l'ENS et pour les années à venir.

Les dernières lignes pour remercier ma famille : mes parents, mes amis et surtout Marion et Théo.

Table des Matières

Remerciements.....	2
Table des Matières.....	1
Abréviations	11
Introduction	13
Chapitre n°1 : présentation des concepts	15
Chapitre n°1-section A - Phénomènes photophysiques dans les molécules organiques	16
I Phénomène d'absorption	16
I.1) Absorption de photon	16
I.1.a) Équations d'absorption.....	16
I.1.b) Caractérisation du phénomène d'absorption linéaire	17
I.1.c) Règles de sélection.....	19
I.2) Absorption à deux photons.....	20
I.2.a) Phénomènes d'optique non-linéaire	21
I.2.b) Intensités de l'ADP	22
I.2.c) Règles de sélection.....	24
I.2.d) Ingénierie des chromophores pour l'ADP	27
II Evolutions d'une molécule dans un état excité	36
II.1) Contexte général.....	36
II.2) Description de la luminescence : diagramme de Perrin-Jablonski.....	37
II.3) Discussion sur les phénomènes décrits par le diagramme de Perrin-Jablonski	39
II.3.a) Conversion interne (CI) et relaxation vibrationnelle (RV)	39

II.3.b) Croisement inter-système (CIS)	39
II.3.c) Fluorescence.....	40
II.3.d) Phosphorescence	40
II.3.e) Phénomène de piégeage des états excités	40
III Caractéristiques du phénomène de fluorescence	41
III.1) Le déplacement de Stokes	41
III.2) Rendement quantique de fluorescence	43
III.3) Temps de vie de luminescence	43
III.4) Le solvatochromisme.....	45
III.5) Cahier des charges spectroscopique	47
Chapitre n°1-section B - Imagerie de fluorescence	48
I Microscopie de fluorescence	49
I.1) Principe de l'imagerie de fluorescence (épi-fluorescence)	49
I.2) La microscopie confocale.....	50
I.3) Optimisation des propriétés spectroscopiques	51
I.3.a) Optimisation du rendement quantique de fluorescence	51
I.3.b) Optimisation du déplacement de Stokes	52
II Exemples de chromophores pour l'imagerie.....	54
II.1) Fluorescence intrinsèque	55
II.2) Exemples de marqueurs	55
III Le défi des milieux biologiques complexes	57
III.1) Pourquoi travailler dans la fenêtre de transparence biologique ?	57
III.2) Les chromophores émettant dans la fenêtre de transparence biologique pour l'imagerie biologique	60
III.2.a) Principes d'ingénierie.....	60
III.2.b) Les xanthènes	61
III.2.c) Les cyanines	61
III.2.d) Les squaraines	63

III.2.e) BODIPY	63
III.2.f) Protéine fluorescente mutante	64
III.2.g) Nanoparticules	65
IV Conclusion	67
Chapitre n°1-section C - Photothérapie dynamique	68
I La PTD : histoire d'une découverte	68
I.1) De l'antiquité	69
I.2) ...aux recherches scientifiques modernes	70
II Le processus photo-dynamique	71
II.1) Avant-propos	71
II.1.a) La photothérapie dynamique de type I	71
II.1.b) La photothérapie de type II	73
II.2) Photophysique de la génération d'oxygène singulet	76
II.2.a) Générer de l'oxygène singulet	76
II.2.b) De l'absorption aux transferts énergétiques, ce qui se cache sous le rendement quantique de génération d'oxygène singulet	77
II.2.c) Efficacité d'inhibition des états excités par l'oxygène	78
II.2.d) Rendement quantique de génération de l'état triplet	79
II.2.e) Efficacité de génération d'oxygène singulet	81
II.2.f) Durée de vie de l'oxygène singulet	82
III Critères cliniques du photosensibilisateur idéal	83
III.1) Déroulement classique d'un traitement	83
III.2) Intérêt du traitement du cancer par la photo thérapie dynamique	84
III.3) Limites d'utilisation actuelle	85
III.4) Le photosensibilisateur idéal : cahier des charges	86
III.5) Photosensibilisateur : propriétés spectroscopiques	87
IV Le photosensibilisateur	87
IV.1) Photosensibilisateurs de première génération	87
IV.2) Nouvelle génération de photosensibilisateurs	89

IV.2.a) La biosynthèse de porphyrine par utilisation de pro-drogues	89
IV.2.b) Optimisation de propriétés d'absorption : dérivatisation des porphyrines.....	90
IV.3) Limitation actuelle	94
IV.4) Bilan.....	95
Chapitre n°2 : Ingénierie moléculaire pour des chromophores pour la PTD-ADP.....	97
I La PTD à deux photons.....	98
I.1) Principe de la photothérapie biphotonique.....	98
I.2) Les avantages de l'absorption à deux photons pour la PTD	99
I.3) Les premiers chromophores étudiés pour la PTD-ADP	99
I.4) Etat de l'art de chromophore pour la PTD-ADP	102
I.5) Optimisation de la production d'oxygène singulet de molécules bi-photoniques ..	107
I.5.a) Le cas des squarines	108
I.5.b) Effet d'atome lourd externe	108
I.5.c) Groupement générateur et transfert de charge	109
II Présentation du projet.....	112
II.1) Choix de la méthode de travail.....	112
II.2) Le choix de la structure carbonée.....	113
II.3) Le choix du groupement générateur d'oxygène singulet	113
II.4) Nomenclature utilisée pour les chromophores	114
II.5) Etude antérieure à cette thèse	115
II.6) Les cibles du travail de thèse.....	116
III Synthèse des chromophores	119
III.1) Synthèse des composés pentamères et tétramères à pont central alcyne.....	119
III.2) Formation d'un pont diyne	122
III.3) Synthèse des cœurs tétrabromés et tribromés	123
III.4) Synthèse des anilines bromées	126

III.5)	Synthèse des pentamères dissymétriques	129
III.6)	Synthèse de la famille tétramère à pont central bi-phényle.....	130
IV	Etude spectroscopique : relation structure réactivité	134
IV.1)	Résultats des études spectroscopiques.....	134
IV.1.a)	Expériences réalisées	134
IV.1.b)	Données expérimentales.....	135
IV.2)	Propriétés spectroscopiques linéaires	135
IV.2.a)	Absorption et émission.....	135
IV.2.b)	Déplacement de Stokes	145
IV.2.c)	Calculs théoriques : rationalisations des observations expérimentales	147
IV.3)	Absorption à deux photons	152
IV.4)	Etudes photophysiques des états excités	160
IV.4.a)	Lien entre la production de 102 et ϕ_{CIS}	160
IV.4.b)	Photophysique des pentamères	163
IV.4.c)	Photophysique des tétramères	165
IV.4.d)	Photophysiques des trimères et des octupôles.....	167
V	Conclusion	169
Chapitre n°3 : Synthèse de nouvelles sondes fluorescentes biphotoniques pour l'imagerie in-vivo		171
I	Imagerie de fluorescence par ADP.....	172
I.1)	Contexte de la visualisation 3D de la vascularisation cérébrale par microscopie à deux photons.	172
I.1.a)	Etat de l'art clinique de l'étude du système vasculaire cérébral	172
I.1.b)	La méthodologie TPLSFM	174
I.1.c)	Avantages et limites de la TPLSFM	175
I.2)	Les sondes pour l'imagerie de fluorescence à deux photons	176
I.2.a)	La sonde idéale.....	176
I.2.b)	Sonde commerciale pour l'imagerie vasculaire par microscopie de fluorescence.....	177
I.2.c)	Les sondes de nouvelles génération pour l'imagerie vasculaire	178

I.3) Conception de nouvelles sondes au laboratoire de Chimie de l'ENS de Lyon.....	180
II Design de nouveaux chromophores pour l'imagerie cérébrale	181
II.1) Conception de nouveaux chromophores	181
II.2) Nomenclature	182
II.3) Synthèse des chromophores	184
II.3.a) Précurseur.....	184
II.3.b) Famille anthracène	184
II.3.c) Famille des phényles.....	186
II.3.d) Famille des fluorènes	187
II.4) Etudes spectroscopiques des précurseurs	189
II.4.a) Présentation des résultats	189
II.4.b) Evolution des propriétés spectroscopiques	191
II.4.c) Sélection de la sonde la plus compétitive.....	195
III Obtention et études spectroscopiques d'une sonde hydrosoluble et de son précurseur	195
III.1) Obtention du précurseur et de la sonde polymère	195
III.2) Solvatochromisme et rendement quantique de fluorescence.....	197
III.2.a) Propriétés d'absorption et d'émission.....	197
III.2.b) Evolution des propriétés à deux photons.....	200
III.2.c) Bilan des propriétés spectroscopiques de 0A-A0-PHEA	202
IV Tests biologiques et applications	203
IV.1) Protocole expérimental	203
IV.2) Vascularisation sanguine : imagerie <i>in vivo</i>	204
IV.3) Marquages des cellules endothéliales.....	206
IV.4) Métabolisation du colorant par l'organisme	208
V Imagerie cérébrale : étude de la vascularisation et cancer	210
V.1) Microscopie de fluorescence	210
V.1.a) Etat de l'art de l'observation de la néo-angiogenèse.....	210
V.1.b) Projet dans le contexte IRM.....	212

V.2)	Utilisation de 0A-A0-PHEA comme référence pour l'IRM.....	213
V.2.a)	Imagerie de fluorescence.....	213
V.2.b)	Comparaison avec l'IRM.....	215
VI	Suivis de traitement en oncologie.....	217
VI.1)	Principe.....	217
VI.2)	Synthèse de nouvelles sondes.....	218
VI.3)	Caractérisations des nouvelles sondes en milieu physiologique	219
VI.3.a)	Solubilité :.....	219
VI.3.b)	Solvatochromisme des dérivés PHEA :	220
VI.3.c)	Résultats d'absorption à deux photons.....	222
VI.4)	Résultats préliminaire en microscopie de fluorescence.....	224
VII	Conclusion et perspective.....	225
 Chapitre 4 : Sondes fluorescentes à deux photons optimisées pour la		
vectorisation de cellules cancéreuses <i>in vivo</i>.....		
I	Exemple de fonctionnalisation permettant la vectorisation.	229
I.1)	Les chaines PEG.....	229
I.2)	Groupeement cationique :	230
I.3)	Dérivé de sucre : membrane cellulaire, cellule cancéreuse.....	231
I.4)	Vectorisation par effet de taille	232
I.5)	Greffage de dérivés biologiques.....	233
II	Polymères et vectorisations.....	234
II.1)	Intérêt des polymères cationiques pour la vectorisation	234
II.2)	Objectif du projet	235
II.2.a)	Groupeements envisagés pour le greffage	236
II.2.b)	Choix du chromophore modèle.....	236
II.3)	Modification de la chaîne polymère.....	237
II.4)	Nouvelle stratégie de synthèse	239

III Etude de la complexation de l'ADN par 0A0-PHEA et 0A0-PIM	241
III.1) Introduction aux études de complexation	241
III.2) Détermination de la constante d'association	243
III.3) Evolution de la fluorescence lors de l'association.....	244
III.3.a) Etude de 0A0-PHEA	244
III.3.b) Etude de 0A0-PIM	245
III.4) Etude thermodynamique.....	247
III.4.a) Equation de Van't Hoff.....	247
III.4.b) Effet de la force ionique.....	247
III.5) Influence de la complexation sur la structure de l'ADN : étude de dichroïsme circulaire.....	249
III.6) Bilan.....	250
IV Etude <i>in cellulo</i> des chromophores	250
IV.1) Principe de l'étude	250
IV.2) Microscopie confocale.....	251
IV.2.a) Cellules F98	251
IV.2.b) Cellules CHO-K1	251
IV.2.c) Co-localisation	254
IV.2.d) Imagerie <i>in vivo</i>	256
V Conclusion	259
Conclusion et perspectives.....	260
Bibliographie.....	263
Annexes.....	283
I Annexe n°1 : Partie expérimentale.....	284
I.1) Synthesis.....	284
I.1.a) Materials and methods	284
I.1.b) Poly-bromide derivative.....	285
I.1.c) Chromophore for imaging.....	312

I.2) Spectroscopy Methods	335
I.2.a) UV-visible	335
I.2.b) Fluorescence.....	335
I.2.c) Singlet oxygen.....	335
I.2.d) Z-scan TPA measurement	336
I.2.e) Two photon induced fluorescence	336
I.2.f) In vivo TLPSM	336
I.2.g) Immunolabeling	338
II Annexe n°2 : Mesures photophysiques	339
II.1) Mesure de section efficace d'ADP	339
II.1.a) Mesure de l'absorption à deux photons par la méthode d'excitation de fluorescence à deux photons (TPEF).....	339
II.1.b) Méthode de mesure de l'absorption à deux photons par la méthode Z-scan.....	340
II.2) Etude de la fluorescence.....	342
II.2.a) La détermination absolue de ϕf	342
II.2.b) Détermination relativiste de ϕf :.....	343
II.2.c) Temps de vie de fluorescence	345
II.3) Mesure du rendement quantique de génération d'oxygène singulet	345
II.3.a) Détection de la phosphorescence	345
II.3.b) Inhibiteur via-réactivité direct.....	346

Abréviations

ADP : Absorption à deux photons

AUO : Absorption à un photon

BHE : Barrière Hémato Encéphalique

CT : *computerized tomography* soit tomodensitométrie dans le texte

DFT : Density Functional Theory soit Théorie de la fonctionnelle de la densité

DMF : diméthylformamide

DMSO : diméthyle sulphoxyde

ESA : excited state absorption

ETU : energy transfert upconversion

eV : électronvolt

FRET : Förster resonance energy transfer soit transfert d'énergie par résonance de type Förster

FTB : fenêtre de transparence biologique

HbO₂ : oxyhémoglobine

HO :HOMO : highest occupied molecular orbital (orbitale moléculaire la plus haute occupée)

Hp : Hémato porphyrine

HpD : dérivé de hémato porphyrine

ICT : intermolecular charge transfert, transfert de charge intramoléculaire dans le texte

IR : Infrarouge

IRM : Imagerie de Résonance Magnétique

LUMO : BV : lowest unoccupied molecular orbital (orbitale moléculaire la plus basse vacante)

NIS : N-iodo succinimide

PTD : PhotoThérapie dynamique

PHEA : poly hydroxyethyl acrylate

QDs : Quantum Dots

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

Abréviations

ROS : Reactive oxygen species

SEC : Size exclusion chromatographie

TA : Température ambiante

THF : tétrahydrofurane

Ti : Sa : Titane-saphir

TPLSFM : Two-photon laser scanning fluorescence microscopy

Introduction

L'absorption à deux photons, phénomène initialement prédit par Maria Göppert-Mayer dès 1929 n'a été caractérisé expérimentalement qu'à partir de 1961, soit un an après la découverte du premier laser. Cette année-là, Kaiser et Garrett rapportèrent en effet la première observation expérimentale d'un phénomène d'absorption biphotonique dans un cristal de $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$. Depuis lors, le développement des lasers n'a cessé d'étendre les champs d'application de ce phénomène, aujourd'hui utilisé dans des domaines aussi variés que la limitation optique, le stockage d'information, l'imagerie, la microfabrication et la photochimiothérapie. Les travaux d'ingénierie moléculaire ont permis de comprendre les relations entre le phénomène d'ADP et la structure de molécules, et ainsi de synthétiser de nouveaux chromophores toujours plus efficaces.

Le travail de cette thèse se focalise sur la synthèse de nouveaux chromophores absorbant à deux photons en vue d'applications en photothérapie dynamique et en imagerie de fluorescence. En effet l'absorption à deux photons apporte de nombreux avantages pour ces domaines d'applications. Les propriétés non-linéaires de ces chromophores permettent notamment d'améliorer la longueur de pénétration des sources lumineuses utilisées dans les organismes vivants ainsi que la résolution de l'excitation, deux paramètres importants pour des applications biomédicales. Bien que pour des applications *in vivo* un cahier des charges des propriétés spectroscopiques doit être respecté, il n'est pas suffisant. Des questions de biocompatibilité doivent se poser, ce qui sera aussi abordé dans ce manuscrit.

Après avoir décrit les phénomènes physiques gouvernant le devenir des états excités d'une molécule suite à un phénomène d'absorption de photons (absorption linéaire puis non-linéaire), les règles d'ingénierie moléculaire permettant de prévoir et d'optimiser ces phénomènes seront présentées. Puis les deux applications plus spécifiquement étudiées dans ce travail de thèse, la microscopie de fluorescence et ses différents domaines d'applications ainsi que la photothérapie dynamique, seront détaillées.

Le second chapitre sera consacré à une étude d'ingénierie pour le développement de chromophores pour la PTD-ADP en utilisant des atomes de brome comme groupe générateur d'oxygène singulet. Différents paramètres dont le nombre et la position des atomes de brome sur la chaîne carbonée, la longueur de conjugaison, la géométrie des chromophores seront étudiés, et leur influence sur les propriétés de génération d'oxygène singulet et d'absorption bi-photonique sera évaluée. Cette étude permettra de mettre en évidence différents critères utiles à l'amélioration de la figure de mérite de ces chromophores pour des applications en photothérapie dynamique à deux photons.

Le troisième chapitre aborde le développement de chromophores pour la microscopie de fluorescence à deux photons *in vivo*. L'optimisation des chromophores met à profit certaines des observations issues de l'étude d'ingénierie moléculaire du chapitre 2 afin d'obtenir un décalage des longueurs d'onde d'absorption à deux photons et d'émission vers le rouge, c'est à dire au sein de la fenêtre de transparence biologique. L'hydrosolubilité et biocompatibilité, nécessaires pour les applications *in vivo*, sont apportées par une approche micellaire covalente développée par le laboratoire. Ces chromophores ont été utilisés comme agents de contraste dans le cadre d'imagerie de vascularisation cérébrale (angiographie) par microscopie intravitale de fluorescence à deux photons. De manière inattendue, ces expériences de microscopie ont permis de mettre en évidence une propriété spécifique d'un des chromophores synthétisé qui est de marquer les cellules endothéliales des parois des vaisseaux sanguins du système cérébral. Ces propriétés permettent d'envisager une nouvelle méthode d'étude des phénomènes d'angiogenèse en appui des techniques d'IRM existantes, dont les modalités seront évoquées en conclusion du chapitre.

Le quatrième chapitre traite enfin de stratégies en cours d'étude visant l'amélioration de la sélectivité des systèmes polymères/chromophores pour des applications intravitales, comme le traitement des tumeurs cancéreuses. Une stratégie de modification des fonctions hydroxy portées par les chaînes polymères par des groupements imidazoliums est présentée. L'étude de complexation des polymères avec l'ADN et des études spectroscopiques *in cellulo* sont également discutées. Enfin, des études de toxicité de ces chromophores en culture cellulaire sont menées.

Ce manuscrit se termine par une conclusion résumant les principaux accomplissements de ce travail de thèse et les perspectives ouvertes.

Chapitre n°1 :

présentation des

concepts

- Chapitre premier-section A. Phénomènes photo-physiques dans les molécules organiques**
- Chapitre premier-section B. Imagerie de fluorescence**
- Chapitre premier-section C. Photothérapie dynamique**

Chapitre n°1-section A - Phénomènes photophysiques dans les molécules organiques

I Phénomène d'absorption

Une caractéristique constante de ce travail de thèse est l'importance de la compréhension des phénomènes photophysiques consécutifs à l'excitation d'un chromophore par une onde lumineuse. Afin de faciliter les discussions ultérieures portant sur ces différents phénomènes, nous allons dans un premier temps, considérer l'ensemble des processus qui peuvent mener une molécule vers un état excité et ceux qui peuvent avoir lieu lors du retour de la molécule à son état fondamental[1, 2]. Ici, il sera uniquement question d'excitation photonique des molécules (rayonnement électromagnétique). Il existe de nombreuses autres manières d'exciter une molécule : chaleur, onde sonore,... Dans le cas d'une excitation électromagnétique, la molécule interagit ainsi avec un quanta d'énergie appelé photon.

I.1) Absorption de photon

I.1.a) Équations d'absorption

Lorsqu'une molécule isolée est soumise à un champ électromagnétique, l'oscillation du nuage électronique qui en résulte induit une variation du moment dipolaire de cette molécule. Cette variation peut s'écrire sous la forme d'un développement en série (Équation A- 1) :

$$\mu = \mu_0 + \alpha E + \beta E^2 + \gamma E^3 + \dots$$

Équation A- 1

avec :

- μ_0 : le moment dipolaire permanent de la molécule,
- α : la polarisabilité d'ordre 1, β, γ, \dots hyperpolarisabilités d'ordre 1, 2,...

En règle générale, les intensités des champs électromagnétiques sont suffisamment faibles pour que l'on puisse négliger les contributions des ordres 2 et suivantes. Les conditions correspondent

alors au domaine de l'optique linéaire. La susceptibilité d'ordre 1, qui est un nombre complexe, nous renseigne, par sa partie réelle, sur l'indice de réfraction de la molécule ; la partie imaginaire caractérise quant à elle le phénomène d'absorption linéaire. Nous allons brièvement décrire ce phénomène.

I.1.b) Caractérisation du phénomène d'absorption linéaire

Dans le cadre de cette thèse, nous nous limiterons aux phénomènes d'absorption par des molécules en solution. L'efficacité avec laquelle la lumière est absorbée par un milieu non-transparent à une longueur d'onde λ est caractérisée par le paramètre d'absorbance $A(\lambda)$ ou de transmittance $T(\lambda)$. Dans des conditions idéales, la loi de Beer-Lambert permet de rendre compte de la capacité d'absorption du milieu associé, pour une concentration en molécule connue, par un coefficient d'extinction molaire, $\varepsilon(\lambda)$, selon l'équation suivante :

$$A(\lambda) = -\log[T(\lambda)] = \log\left[\frac{I_{\lambda}^0}{I_{\lambda}}\right] = \varepsilon(\lambda).l.c$$

Équation A- 2

avec :

- $\varepsilon(\lambda)$: coefficient d'extinction molaire ($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$),
- c : concentration (mol/L),
- l : longueur du trajet optique contenant le milieu absorbant (cm^{-1}).

La loi de Beer-Lambert est une loi limite. Le domaine de validité est propre à chaque composé considéré et à la manière dont il va interagir avec son environnement : à concentration élevée la distance moyenne entre les espèces diminue au point que chaque molécule peut perturber la distribution de charge de sa voisine, voire subir un phénomène d'agrégation. Ces perturbations modifient la capacité d'absorption des molécules, la loi n'est donc plus vérifiée. Les limitations peuvent également être induites par l'appareillage : l'intensité de lumière transmise peut devenir trop faible pour permettre une détection dans un milieu très absorbant. Afin de s'affranchir de ces phénomènes, on limite donc généralement l'absorbance à 1.

En solution, la solvation des molécules change l'allure du spectre. On observe des transitions entre l'état fondamental et un état excité avec différents niveaux vibroniques mis en jeu (Figure A-1). On observe alors des spectres de bandes avec une largeur à mi-hauteur qui caractérise la nature de la transition. Le phénomène d'absorption peut être décrit à partir de potentiel de Morse

représentant les états électroniques. À température ambiante, la loi statistique de Boltzmann implique que toutes les molécules se trouvent dans le niveau électronique fondamental S_0 . D'après le principe de Franck-Condon, qui stipule que les noyaux atomiques restent immobiles durant les processus électroniques, l'absorption pourra être décrite par des flèches verticales partant de cet état fondamental. L'absorption d'un photon peut alors porter la molécule dans un état vibrationnel d'un des états électroniques excités de même multiplicité de spin.

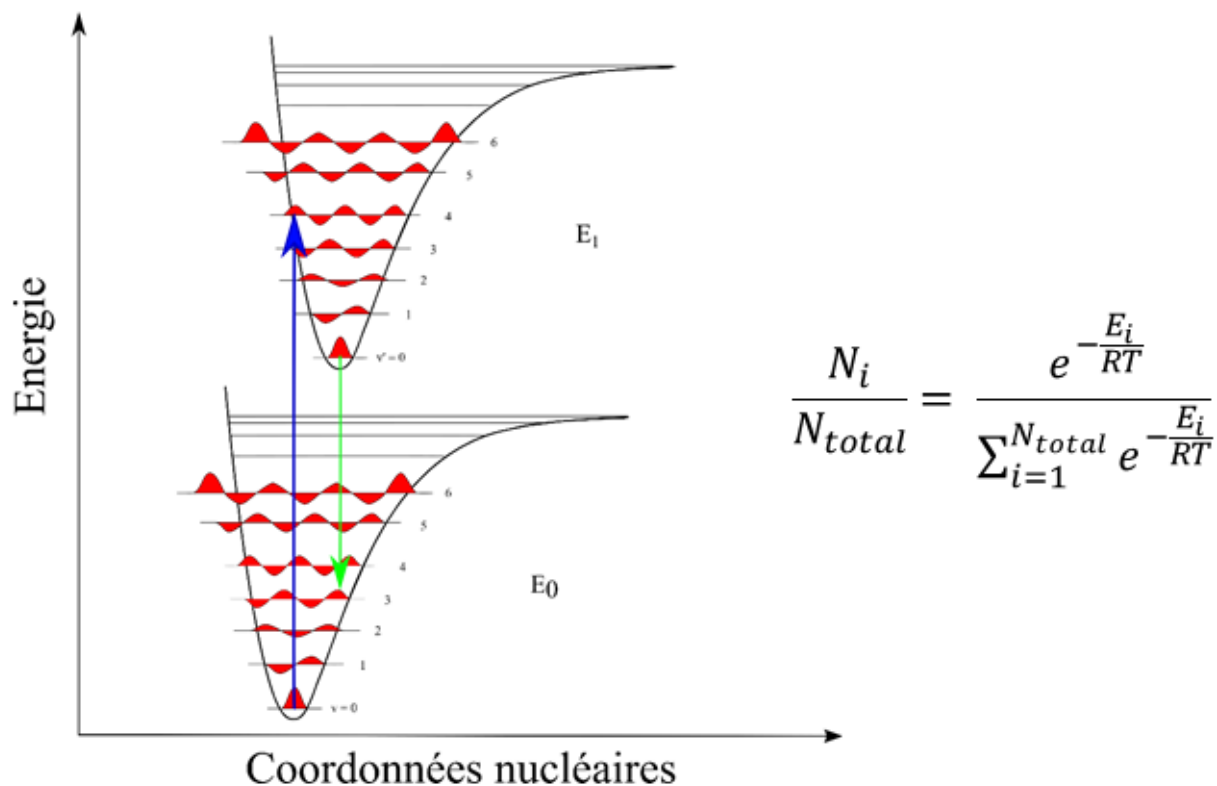


Figure A- 1 : Illustration du principe de Franck-Condon.

C'est ce type de spectre qui sera discuté dans la suite de cette thèse. La position de la bande d'absorption tout comme celle de la bande d'émission (*vide infra*) est sensible aux conditions expérimentales et à la structure moléculaire. Un vocabulaire spécifique permet de rendre compte de ces modifications : lorsqu'un phénomène provoque une augmentation (diminution) de la longueur d'onde on parle d'effet *bathochrome* (*hypsochrome*). Si cet effet provoque une augmentation (diminution) du coefficient d'extinction molaire (ou plus généralement de l'intensité de la bande spectrale) on parle d'effet *hyperchrome* (*hypochrome*).

I.1.c) Règles de sélection

Comme tout phénomène quantique, des règles de sélection régissent ces phénomènes. Deux nombres quantiques caractérisent l'état d'une molécule. Ils correspondent au moment cinétique orbitale (\vec{L}) et au moment cinétique intrinsèque ou de spin (\vec{S}). Les principales règles de sélection pour les transitions d'absorption sont :

- La conservation du spin : une transition n'est possible qu'entre états de même multiplicité de spin. ($\Delta S = 0$). Cependant, il est possible de transgresser cette règle de sélection grâce au couplage spin-orbite ($\Delta S \neq 0$), généralement induit par la présence d'atomes lourds.
- La règle de sélection orbitale : l'intensité de la transition est proportionnelle à $|\mu_{if}|^2$ avec $\mu_{if} = \int \psi_f^* \hat{\mu} \psi_i d\tau$ où $\hat{\mu}$ est l'opérateur moment dipolaire de transition. La transition est observable uniquement si $|\widehat{\mu}_{if}| \neq 0$, soit $\Gamma_{\psi_f} \otimes \Gamma_{\mu} \otimes \Gamma_{\psi_i} \supset A_1$ où A_1 est la représentation irréductible totalement symétrique. Le caractère interdit d'une transition électronique pour raison de symétrie peut être levé, car le couplage de cette dernière avec les transitions vibrationnelles et rotationnelles provoque des écarts par rapport à la symétrie générée pour une transition « purement » électronique[3, 4]. L'approximation de Born-Oppenheimer n'est plus vérifiée et la relation exacte est $\Gamma_{\psi_{ele,f}} \otimes \Gamma_{\psi_{vib,f}} \otimes \Gamma_{\mu} \otimes \Gamma_{\psi_{ele,i}} \otimes \Gamma_{\psi_{vib,i}} \supset A_1$. On peut relier le carré du moment dipolaire à la force d'oscillateur f . Dans une première approximation, on peut assimiler la force d'oscillateur comme étant proportionnelle à la valeur du ε déterminée par spectroscopie UV-visible[5]. Le tableau ci-dessous relie le caractère permis ou non de l'absorption aux valeurs classiquement rapportées pour le coefficient d'absorption molaire. Dans le cadre de cette thèse, la très grande majorité des chromophores utilisés sera associée à des transitions permises à fortement permises.

$\varepsilon \leq 10$	Transition interdite
$10 \leq \varepsilon \leq 100$	Transition faiblement permise
$1000 \leq \varepsilon \leq 100000$	Transition permise
$\varepsilon \geq 100000$	Transition fortement permise

Tableau A- 1 : valeur du coefficient d'absorption molaire en fonction de la nature de la transition.

I.2) Absorption à deux photons

Ce phénomène sera commun à l'ensemble des molécules synthétisées au cours de cette thèse.

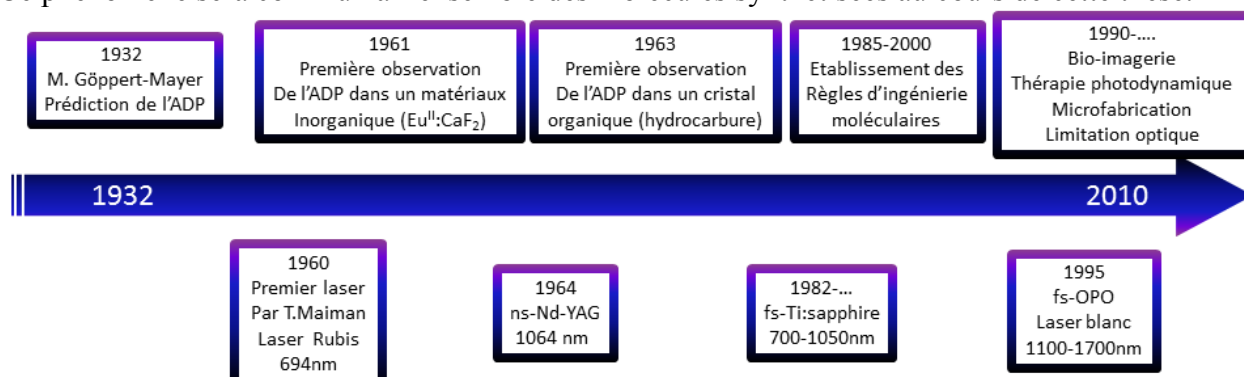


Figure A- 2 : Développement de l'absorption à deux photons en fonction du développement des sources lasers.

L'absorption à deux photons (ADP) est un phénomène d'optique non linéaire. Maria Goeppert-Mayer, physicienne et prix Nobel, prédit ce phénomène physique en 1931, dans le cadre de sa thèse de doctorat, sur des bases uniquement théoriques[6]. Ce n'est cependant que 30 ans plus tard, en 1961 soit un an après la découverte du premier laser, que Kaiser et Garrett rapportèrent la première observation expérimentale d'un phénomène d'absorption biphotonique dans un cristal de $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$ par irradiation à 694,3 nm dans le rouge à partir d'un laser pulsé cristal-rubis[7]. Ils observèrent alors l'émission caractéristique du cristal dans le bleu autour de 425nm (Figure A- 3).

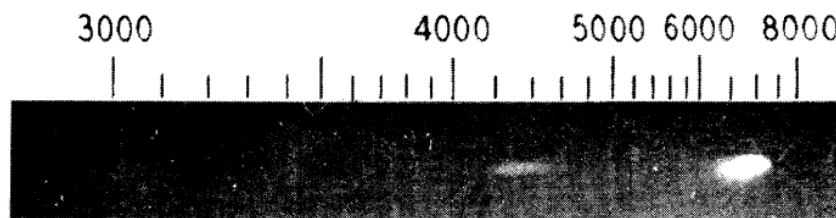


Figure A- 3 : positif de la plaque photographique montrant l'émission dans le bleu pour une excitation à 694,3nm.

En 1963, Peticolas et coll publièrent le premier exemple d'ADP de molécule organique sur des cristaux d'hydrocarbures. Ces cristaux, excités à deux photons, étaient fluorescents. Le concept sous-jacent était la fluorescence induite à deux photons (FIDP), utilisée de nos jours pour l'imagerie. Le développement de l'ADP a été lié à celui du laser, que ce soit pour la gamme des longueurs d'onde accessibles ou pour la résolution temporelle[8]. La découverte et le perfectionnement constant des sources laser utilisées ont conduit de nombreux chimistes à travailler sur la structure moléculaire pour déterminer des règles d'ingénierie moléculaire permettant de développer des composés organiques possédant de fortes ADP sur toute la gamme de longueurs d'onde accessibles (du proche UV jusqu'au proche infrarouge)(Figure A- 2).

I.2.a) Phénomènes d'optique non-linéaire

I.2.a.i) Absorption multi-photonique

Pour comprendre l'origine de l'ADP, il faut s'intéresser une nouvelle fois à l'équation de la polarisation d'une molécule soumise à un champ électromagnétique (Équation A- 1). Lorsque l'intensité lumineuse incidente devient très importante, typiquement lorsque la source lumineuse utilisée est une source laser, la polarisation induite de la molécule, n'est plus linéairement proportionnelle à l'intensité lumineuse. Les termes quadratiques, cubiques et supérieurs deviennent alors accessibles, on parle d'hyperpolarisabilité : plusieurs photons coïncident en un point unique et vont pouvoir interagir simultanément avec la molécule. Deux types d'interactions peuvent ainsi être observées (Figure A- 4). Des interactions non-résonantes, pour lesquelles aucun peuplement des états excités n'est observé. Ces interactions n'impliquent pas d'absorption (ou résonance) et peuvent donc avoir lieu quelle que soit la longueur d'onde de la source. Les phénomènes qui en découlent sont nommés génération de seconde harmonique, GSH (terme quadratique), génération de troisième harmonique GTH (terme cubique),... Le second type d'interaction regroupe les interactions résonantes qui conduisent à une absorption avec peuplement d'états excités. Elles ont lieu pour des gammes de longueurs d'onde qui permettent l'absorption. Cette interaction dépend de la partie imaginaire de l'hyperpolarisabilité. L'ADP est une interaction résonante à deux photons, l'ATP à trois photons,... Il a été observé l'absorption simultanée de 2, 3, 4 jusqu'à 5 photons[9].

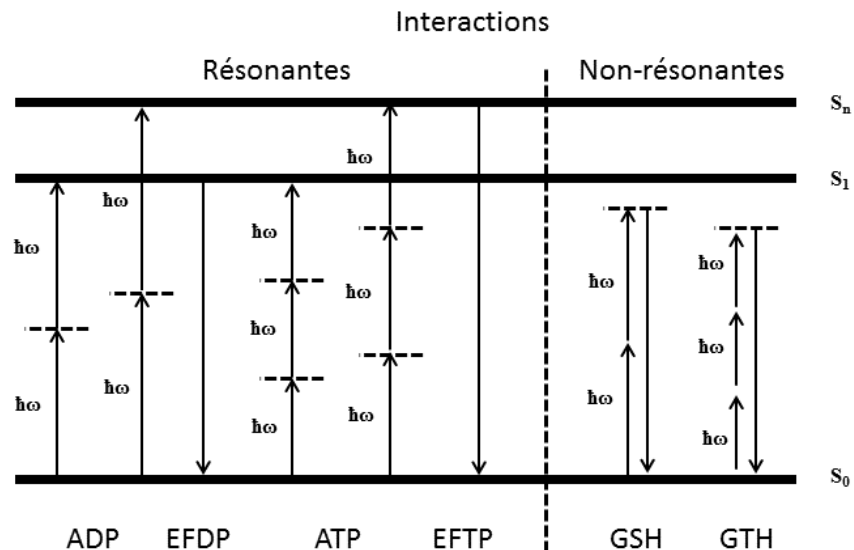


Figure A- 4 : Phénomènes d'optique non-linéaires résonants et non-résonants.

Dans le cadre de cette thèse nous ne discuterons que des phénomènes résonants, et particulièrement d'absorption à deux photons. Nous regarderons donc uniquement les effets sur la polarisabilité d'ordre 3 (γ).

I.2.a.ii) Absorption à deux photons

L'absorption à deux photons (ADP) correspond à l'absorption simultanée de deux photons de même énergie $\hbar\omega$ ou de deux photons d'énergie différente $\hbar\omega_1$ et $\hbar\omega_2$. Cette double absorption se fait via un état virtuel intermédiaire (Figure A- 5). Cet état virtuel ne correspond pas un état de résonance de la molécule, et aucune durée de vie ne peut lui être associée. On parle donc d'absorption simultanée.

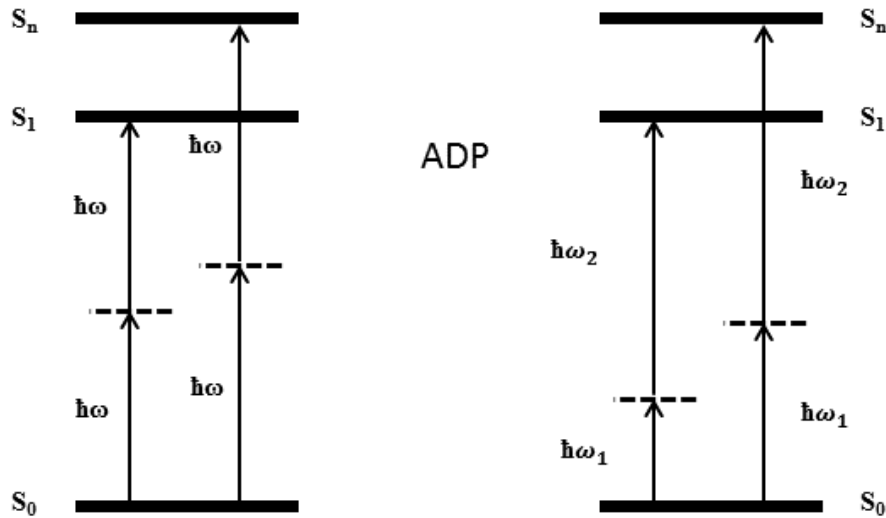


Figure A- 5 : Représentation de l'ADP. Les traits pointillés symbolisent l'état virtuel.

I.2.b) Intensités de l'ADP

Le phénomène d'atténuation de la lumière à travers une solution absorbante dépend des caractéristiques moléculaires des composés en solution. La variation d'intensité lumineuse au sein d'une solution absorbante peut être exprimée par l'équation ci-dessous [9] :

$$\frac{dI(z)}{dz} = -\alpha_1 I(z) - \alpha_2 I(z)^2 - \alpha_3 I(z)^3 - \alpha_4 I(z)^4 \dots$$

Équation A- 3

avec :

- $I(z)$, l'intensité de la lumière incidente selon l'axe Z .
- α_i , le coefficient d'absorption à i -photons

Cette équation n'est vraie que si l'intensité est indépendante du temps et est uniforme transversalement. Dans le cas où il n'y a pas d'absorption linéaire ($\alpha_1 = 0$) à la longueur d'onde d'excitation et que seules les conditions pour une excitation bi-photonique sont satisfaites, l'ADP est caractérisée par l'Équation A- 4. Cette équation illustre la dépendance quadratique de l'ADP par rapport à l'intensité incidente. Corollairement, si un phénomène d'absorption vérifie une dépendance quadratique avec l'intensité incidente du laser, alors ce phénomène correspondra nécessairement à une absorption bi-photonique. La seconde conséquence liée au fait que la probabilité pour une molécule de subir une ADP soit proportionnelle au carré de l'intensité locale est que cette probabilité (et donc ce phénomène) ne deviendra significative qu'à forte intensité incidente, justifiant l'observation du phénomène uniquement au point focal d'une irradiation laser pulsé.

$$\frac{dI(z)}{dz} = -\alpha_2 I(z)^2$$

Équation A- 4

L'Équation A- 4 est une équation différentielle, dont la solution peut être exprimée sous la forme :

$$I(z, \lambda) = \frac{I_0(\lambda)}{1 + \alpha_2(\lambda) * I_0(\lambda) * z}$$

Équation A- 5

avec :

- $I_0(\lambda)$ l'intensité de la lumière incidente à la longueur d'onde λ ,
- $\alpha_2(\lambda)$, le coefficient d'absorption à deux photons à la longueur d'onde λ .

Comme toute grandeur macroscopique, $\alpha_2(\lambda)$ dépend de la concentration en molécules absorbant à deux photons. L'expression de $\alpha_2(\lambda)$, dans l'hypothèse où la majorité des molécules restent dans leur état fondamental (c'est-à-dire loin de la saturation), peut se réécrire selon l'Équation A- 6.

$$\alpha_2(\lambda) = \sigma'_{ADP} * N_0 = \sigma'_{ADP} * N_a * C * 10^{-3}$$

Équation A- 6

avec :

- σ'_{ADP} section efficace moléculaire d'absorption à deux photons (cm^4/GW),
- N_0 densité moléculaire de l'échantillon ($1/\text{cm}^3$),
- N_a constante d'Avogadro,
- C concentration molaire (mol/L).

Bien que le paramètre σ'_{ADP} soit directement mesurable, la grandeur, généralement reportée dans les publications, est la section efficace d'absorption à deux photons rapportée à l'énergie du photon de l'intensité incidente :

$$\sigma_{ADP} = \sigma'_{ADP} * h\nu$$

Équation A- 7

avec :

$$- \sigma_{ADP} \text{ en cm}^4.\text{s.}$$

Les valeurs de σ_{ADP} exprimées dans cette unité sont très faibles, généralement comprises entre 10^{-51} et 10^{-46} cm⁴.s. Pour ces raisons, une unité plus appropriée a été introduite, le Goeppert-Mayer (GM) avec 1 GM = 10^{-50} cm⁴.s. Les sections efficaces peuvent être calculées par différentes méthodes. Les deux méthodes usuelles, méthode Z-scan et méthode de fluorescence induite par ADP sont présentées annexe n°2.

I.2.c) Règles de sélection

Les transitions d'ADP sont possibles seulement entre états de même parité. Les transitions autorisées dépendent donc de la symétrie du système étudié. Pour les molécules possédant un centre d'inversion, les transitions sont du type $u \rightarrow u$ et $g \rightarrow g$ et non entre des états de symétries différentes ($u \rightarrow g$ et $g \rightarrow u$). Les états g et u se rapportent aux caractères symétriques et antisymétriques par rapport au centre de symétrie. Ces règles de sélection impliquent que, pour les molécules centrosymétriques, les transitions permises à deux photons ne sont pas permises à un photon. Pour les molécules sans centre d'inversion, les transitions peuvent être permises à la fois à un et à deux photons. D'un point de vue théorique, la section efficace est contenue dans la partie imaginaire de la polarisabilité d'ordre 3 selon l'équation :

$$\sigma_{ADP} = \frac{3}{2} \frac{\hbar \omega^2 \text{Im}[\chi(-\omega; \omega, \omega, -\omega)]}{\epsilon_0 c^2}$$

Équation A- 8

Pour pouvoir décrire simplement ce phénomène, un modèle à trois niveau a été proposé[10] (Figure A- 6) dont la validité est largement confirmée par les observations spectroscopiques (Figure A- 7).

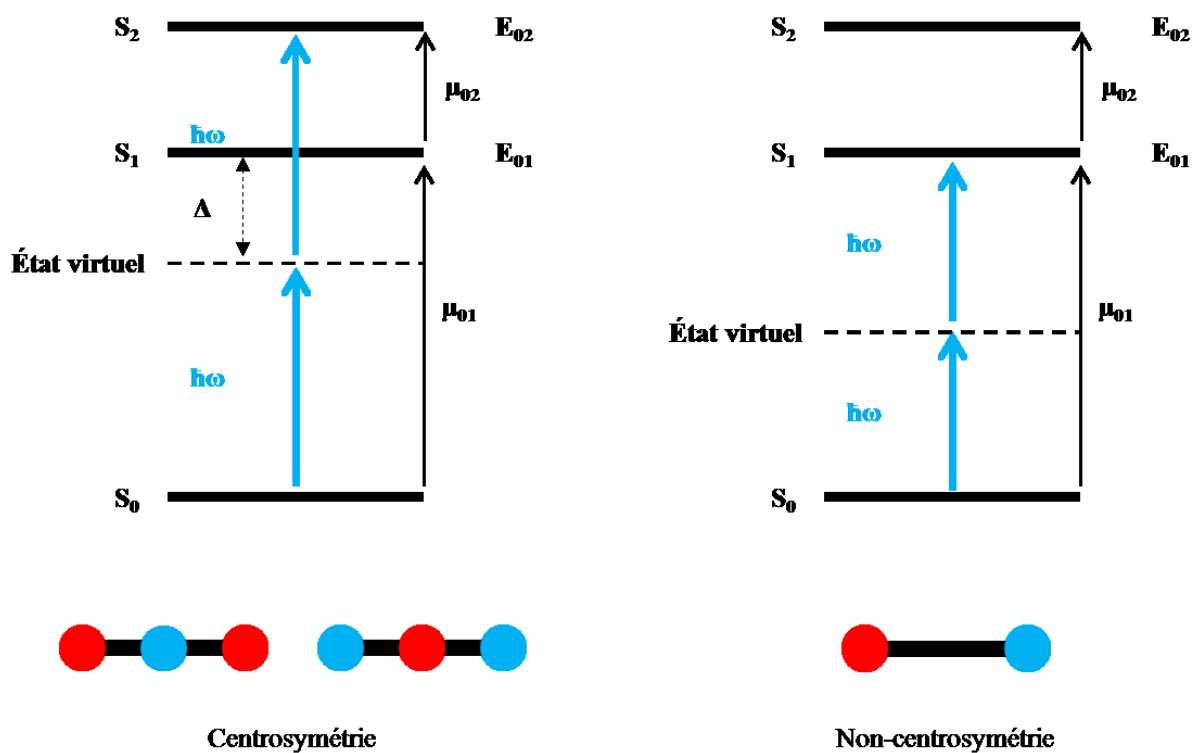


Figure A- 6 : ADP dans le cas des molécules centrosymétriques quadripolaires (gauche) et non-centrosymétriques (droite) décrit par un modèle à 3 niveaux.

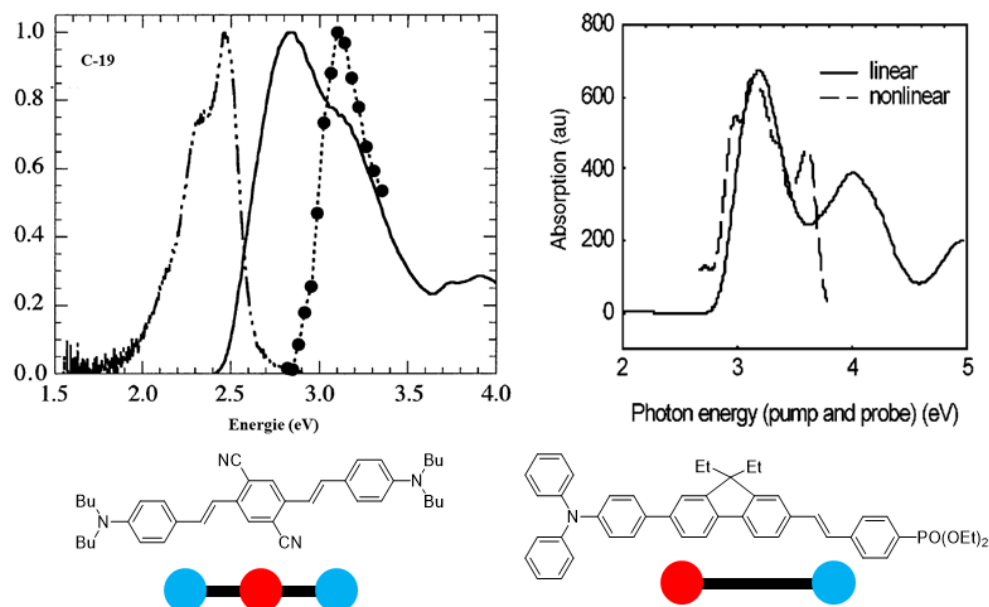


Figure A- 7 : Résultats spectroscopiques dans le cas d'une molécule centrosymétrique (gauche) et non centrosymétrique (droite)[11, 12].

Ce modèle permet d'exprimer la polarisabilité cubique γ en ne tenant compte que des deux premiers états excités (S_1 et S_2) et de l'état fondamental (S_0). L'expression de ce terme γ est décomposée en trois termes selon l'Équation A- 9.

$$\gamma(-w; w, w, -w) \propto \left[\begin{array}{l} + \frac{M_{01}^2 \Delta \mu_{01}^2}{(E_{01} - \hbar w - i \Gamma)^2 (E_{01} - 2\hbar w - i \Gamma)} (D) \\ - \frac{M_{01}^4}{(E_{01} - \hbar w - i \Gamma)^2 (E_{01} + \hbar w - i \Gamma)} (N) \\ + \frac{M_{01}^2 M_{12}^2}{(E_{01} - \hbar w - i \Gamma)^2 (E_{02} - 2\hbar w - i \Gamma)} (2P) \end{array} \right]$$

Équation A- 9

avec :

- M_{ij} : moment dipolaire de transition entre les états singulet i et singulet j,
- $\Delta \mu_{ij}$: variation du moment dipolaire entre l'état S_i et l'état S_j ,
- E_{0i} : énergie de transition entre l'état fondamental et l'état excité singulet i,
- Γ : largeur homogène

Le terme D est appelé terme dipolaire. Il est présent uniquement dans les molécules non-centrosymétriques. Son expression, proche de l'expression de β (polarisabilité d'ordre 2), implique une forte variation du moment dipolaire de la molécule lors de la transition. Ce terme D décrit le phénomène de résonance biphotonique entre l'état fondamental S_0 et l'état excité S_1 . Les molécules quadripolaires (centrosymétriques) ont un moment dipolaire statique nul à l'état fondamental comme à l'état excité, ce qui implique $\Delta \mu_{01} = 0$ et le terme D s'annule.

Le terme 2P est relatif à la résonance à deux photons et appelé terme de résonance. Il correspond à une résonance entre S_0 et S_2 et dépend du couplage entre les états excités (S_1 et S_2 dans le cas d'un modèle à trois états). Pour une molécule quadripolaire, seul le terme 2P est pris en compte.

Le terme N est appelé terme négatif. Il correspond à la résonance à un photon et peut être négligé dans la plupart des cas.

Selon le modèle à trois niveaux la section efficace à deux photons peut s'écrire, pour les molécules centrosymétriques :

$$\gamma \propto \frac{M_{01}^2 M_{12}^2}{\Delta^2 \Gamma}$$

Équation A- 10

avec Δ l'écart énergétique entre l'état virtuel et l'état S_1 qui permet d'expliquer l'effet de résonance pour les composés quadripolaires.

I.2.d) Ingénierie des chromophores pour l'ADP

L'ingénierie des chromophores à deux photons est abondamment référencée [9, 13-15], et les paramètres permettant de faire le lien entre la structure et les propriétés d'ADP des chromophores sont aujourd'hui parfaitement identifiés. Contrairement aux phénomènes quadratiques, l'observation de l'ADP, reliée à la polarisabilité d'ordre trois (γ), n'impose pas de contrainte de symétrie comme nous l'avons vu précédemment. Les deux paramètres qui permettent l'observation de fortes sections efficaces ADP sont la forte polarisation ou polarisabilité du nuage électronique et la conjugaison au sein du chromophore. La forte asymétrie électronique réduit l'écart HO-BV, augmente le moment dipolaire et le moment de transition, ce qui renforce la section efficace. L'augmentation de la conjugaison permet aussi de réduire l'écart entre la HO et la BV. Selon ce modèle, trois grandes familles de chromophores ont été étudiées : les molécules dipolaires et les molécules octupolaires, qui sont deux familles non-centrosymétriques et les molécules quadripolaires centrosymétriques (Figure A- 8). Les composés dipolaires sont composés d'un centre accepteur d'électron (A) et d'un centre donneur d'électron (D) disposés de part et d'autre d'une chaîne conjuguée (π). Cet ensemble est noté A- π -D. Pour les quadripôles plusieurs configurations sont possibles et peuvent être notées A- π -A, D- π -D, A- π -D- π -A, D- π -A- π -D,... Ces deux classes de molécules sont linéaires, à la différence des octupôles dont la structure est orientée selon deux ou trois directions de l'espace. Les octupôles consistent en des structures en étoile dont le centre est accepteur (donneur) d'électrons alors que les extrémités des branches portent des groupements donneurs (accepteurs).

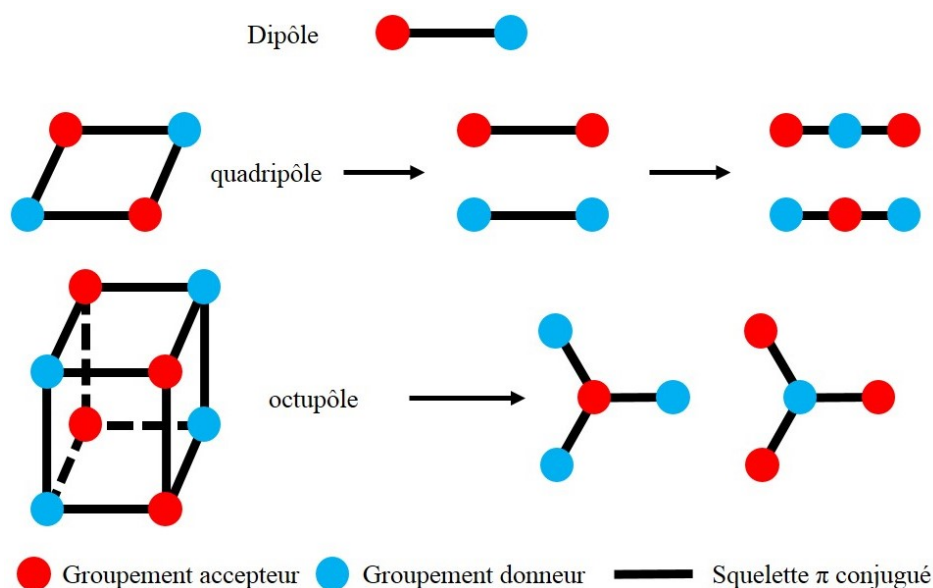


Figure A- 8 : Différentes symétries étudiées dans le cadre de l'ADP.

I.2.d.i) Transfert de charge

L'absorption biphotonique est liée à l'existence d'un fort transfert de densité électronique lors du passage du chromophore de son état fondamental et son état excité. Ce transfert, appelé transfert de charge intramoléculaire (TCI), est conditionné par la présence des groupements π -donneur et/ou π -accepteur et par la longueur de la conjugaison. La position des groupements accepteurs et donneurs, déterminant la force du transfert de charge, diffère en fonction de la symétrie du système. L'introduction simultanée d'un groupement donneur (phényl amine) et d'un groupement accepteur phényl(nitro) sur une molécule de E-stylbène (**A-1**) permet d'augmenter d'un facteur 10, la section efficace (**A-2** et **A-3**)[16], démontrant l'importance du paramètre de TCI dans l'efficacité du phénomène d'ADP. Dans le cas des dipôles, les effets électroniques associés aux substituants terminaux de part et d'autre du système conjugué sont opposés (Figure A- 9).

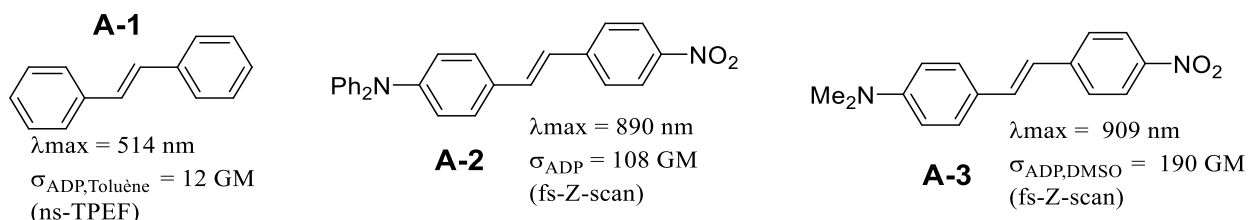


Figure A- 9 : Effet du transfert de charge dans les dipôles.

Pour les quadripôles, le transfert de charge se fait entre le centre et la périphérie. Cet effet quadripolaire permet d'amplifier le terme 2P de l'absorption à deux photons alors que le terme D s'annule (Équation A- 9)[14]. Des exemples de quadripôles sont donnés par la Figure A- 10. On peut voir que les sections efficaces sont du même ordre de grandeur voire plus importantes que dans le cas des dipôles[17, 18]. Les règles de sélection expliquent le décalage hypsochrome de la longueur d'onde d'ADP.

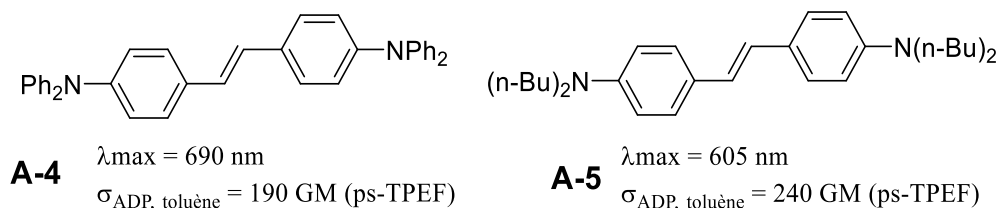


Figure A- 10 : exemple de quadripôle dérivé de E-stylbène.

L'explication vient du fait que l'état virtuel est proche de l'état S_1 . En conséquence, le terme $E_{01} - \hbar\omega$, au dénominateur du terme 2P de l'équation A-9 est amoindri, conduisant à une exhalation globale de la valeur de la section efficace. En d'autres termes, la résonance entre ces niveaux (terme Δ élevé dans l'Équation A- 9) permet une augmentation du terme 2P.

La structure octupolaire est particulière : il s'agit en effet d'une structure non-centrosymétrique ne possédant pas de moment dipolaire permanent. Ces composés ont été utilisés pour l'optique non-linéaire du second ordre[10]. Prasad *et coll.* ont montré l'effet coopératif sur les chromophores **A-6**, **A-7** et **A-8** (Figure A- 11)[19]. La section efficace augmente plus vite que le nombre de branches ajoutées. Cet effet coopératif est attribué soit à une communication électronique entre les branches soit à un couplage excitonique[10, 20].

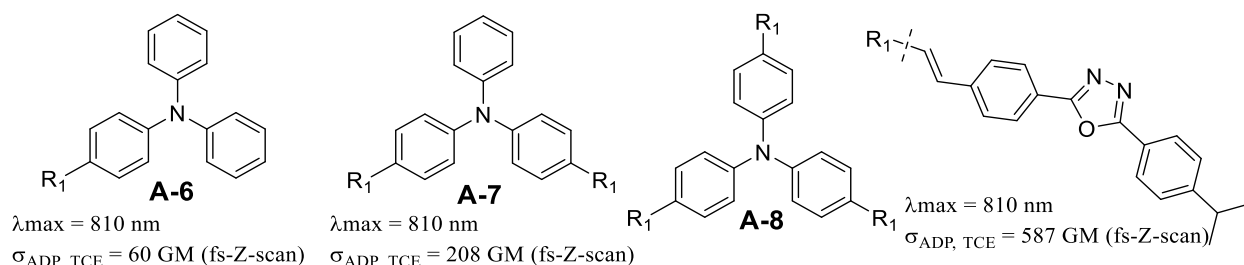


Figure A- 11 : Effet coopératif dans les octupoles.

Le couplage excitonique est aussi observé dans les dendrimères, qui peuvent dans une large mesure être considérés comme des « octupôles étendus »[21]. Les composés **A-9** à **A-11** sont un exemple de famille de dendrimères (Figure A- 12). La répétition N fois d'un synthon R dans les structures moléculaires permet d'augmenter la section efficace d'ADP, par un facteur supérieur à N (Tableau A- 2).

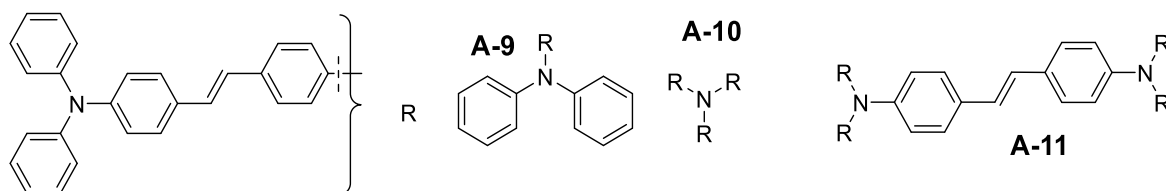


Figure A- 12 : Exemple d'une famille de dendrimères.

Chromophore	N	λ_{max}^{TPA} (nm)	$\sigma_{2,max}$ (GM)	σ_2/N (GM)
A-9	2	670	320	160
A-10	4	680	1300	320
A-11	6	694	2700	460

Tableau A- 2 : section efficace en fonction de N.

De nombreux exemples de dendrimères sont reportés dans la littérature[22, 23]. L'utilisation du couplage excitonique dans les oligomères à N blocs permet, en limitant le transfert de charge au sein des unités, d'observer une évolution constante de ε en fonction de N alors que la section efficace augmente. Ce phénomène a été prévu théoriquement par Spano et coll[24]. Andraud et coll. l'ont observé sur des oligomères de fluorène[25]. Bien que cette stratégie soit

incontestablement efficace dans l'obtention de molécules présentant un bon compromis entre faible absorption linéaire (transparence) dans le visible et forte efficacité d'absorption biphotonique, une limitation de l'utilisation des octupôles et des dendrimères réside dans les difficultés de synthèse.

I.2.d.ii) Modulation du transfert de charge

Le transfert de charge dépend de la force des groupements donneurs et accepteurs, et des variations importantes d'efficacité d'ADP sont observées en fonction de la nature des groupements donneur/accepteur inductifs et/ou mésomères. Les groupements donneurs usuels sont les amines tertiaires, les alkoxys et thio-éthers. Les groupements accepteurs peuvent être des aldéhydes, des groupements nitros, trifluorométhane sulfonyl, halogènes ou des dérivés de type cyano (TCF). Dans les dipôles il est important de maximiser la dissymétrie électronique entre les deux extrémités du chromophore (Figure A- 13). A un groupement π -donneur (π -accepteur) fixé on peut voir que plus un groupement π -accepteur (π -donneur) fort lui est associé, plus le transfert de charge est important. Ainsi, dans les molécules **A-12** et **A-13**, où le groupe phosphonate est remplacé par un groupement nitro, meilleur accepteur, la section efficace est fortement augmentée (1300 vs 690 GM) ; en même temps la longueur d'onde d'ADP est décalée vers le rouge ($\Delta\lambda_{ADP}=70\text{nm}$)[11]. De manière univoque (molécule **A-14** à **A-17**), si un alkoxyphenyl est remplacé par un groupement dialkylaniline (plus donneur) les conséquences sont identiques : augmentation de la section efficace (100 vs 176 GM à 1050 nm) et décalage de la longueur d'onde (880 vs 1050 nm). Dans les dipôles, l'augmentation de la force des groupements donneurs et accepteurs se traduit par deux phénomènes : l'augmentation de la section et un décalage bathochrome de la longueur d'onde d'absorption. Le décalage de la longueur d'onde vers le rouge peut être appréciable en vue d'application en biologies, comme nous le verrons dans la suite de cette introduction.

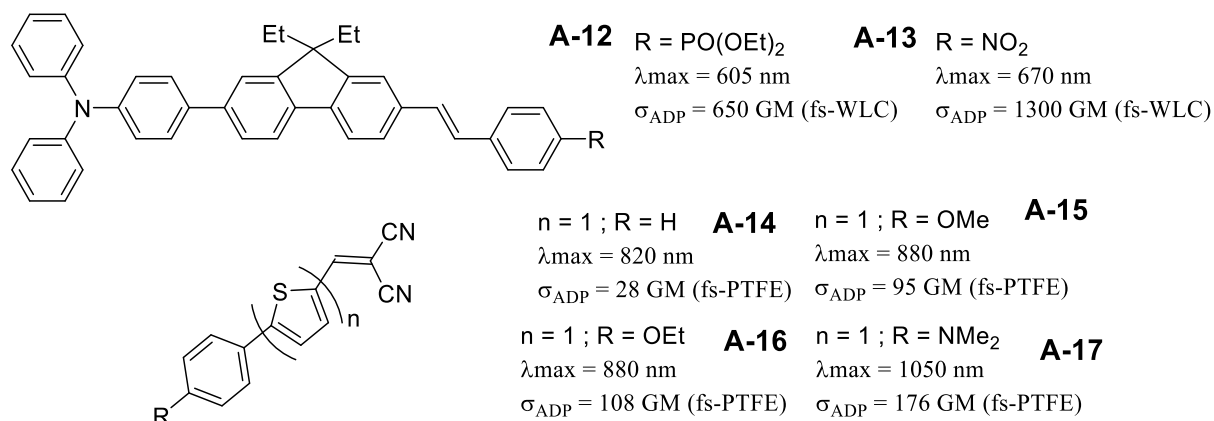


Figure A- 13 : Exemple de dipôle absorbant à deux photons.

Dans les quadripôles, le transfert de charge a lieu de la périphérie vers le centre. Les structures D- π -D et A- π -A peuvent être optimisées en ajoutant respectivement des centres accepteurs et donneurs au centre du chromophore (D- π -A- π -D et A- π -D- π -A) car ils renforcent le transfert de charge (Figure A- 14). Ces propriétés sont illustrées par le chromophore **A-18** (D- π -D). Si un groupement donneur est placé sur le phényle central **A-21** (D- π -D- π -D), une faible augmentation de la section efficace (à la limite de la marge d'erreur) est observée[18]. En revanche, si un groupement accepteur est placé sur le phényle central **A-20** (D- π -A- π -D) une augmentation significative de section efficace et un déplacement bathochrome sont observés[12]. Ces propriétés ont permis de développer des chromophores possédant des sections efficaces de plusieurs milliers de GM : le composé **A-22** (A- π -D- π -A) en est un exemple[17, 26]. La comparaison de ce dernier avec le chromophore **A-19** montre que la position centrale est importante pour avoir une délocalisation de la charge maximisée sur l'ensemble de la molécule.

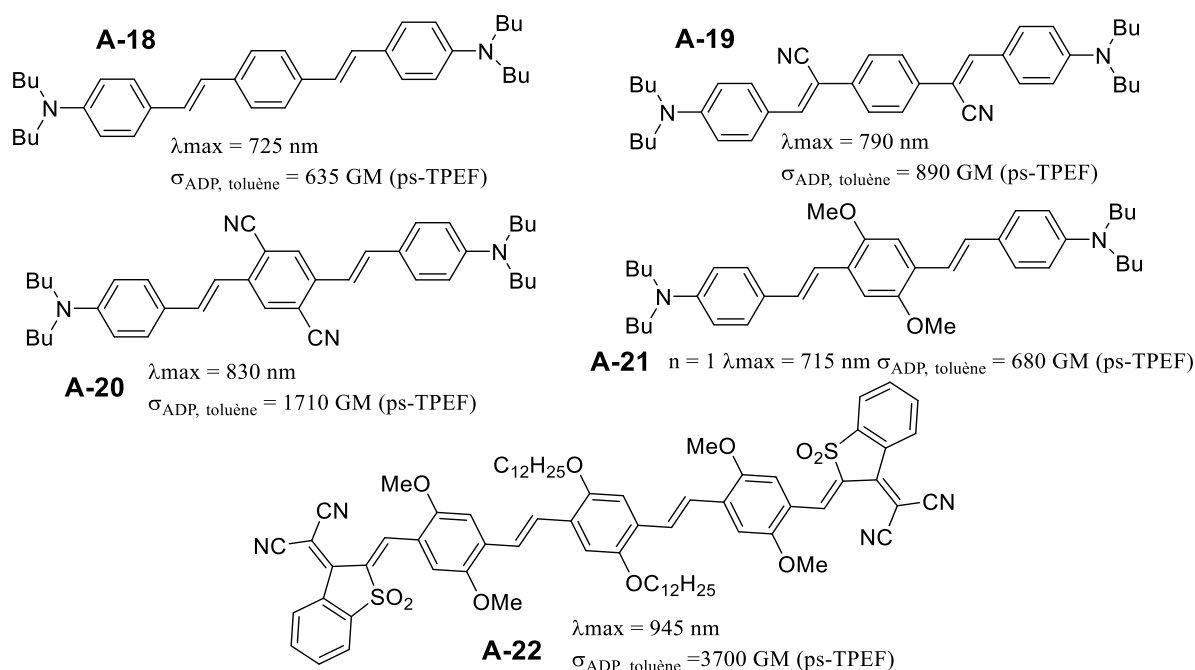


Figure A- 14 : Evolution de la section efficace d'ADP en fonction du transfert de charge dans les composés quadripolaires. Dans les octupôles, les stratégies d'optimisation sont globalement les mêmes que pour les quadripôles (Figure A- 15). Si le centre est accepteur (donneur) alors les extrémités doivent être donneuses (acceptrices). La supériorité des fonctions aniline par rapport aux groupements alkoxyphényle est aussi observée (**A-23** vs **A-24**)[27]. Le groupement $-\text{SO}_2\text{CF}_3$ apparaît comme un puissant groupe accepteur **A-27**[28, 29].

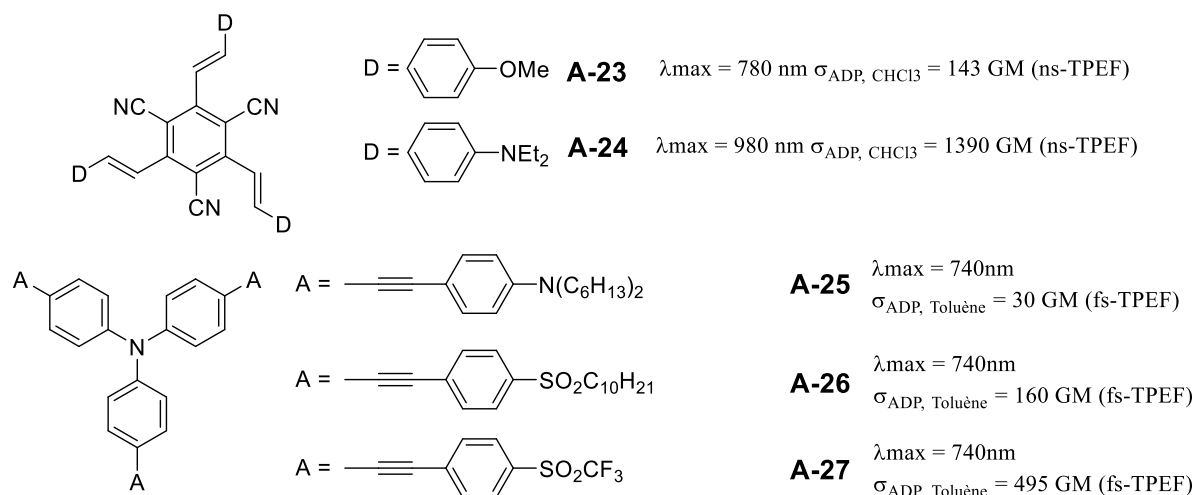


Figure A- 15 : Exemples d'octupôle absorbant à deux photons.

I.2.d.iii) Influence de la conjugaison

Vers une délocalisation toujours plus étendue

Pour un couple donneur/accepteur donné, l'optimisation de l'ADP passe également par une conjugaison étendue permettant une meilleure délocalisation électronique. Une meilleure délocalisation électronique augmente la valeur du moment dipolaire ou quadripolaire. Ainsi la p-nitroaniline (Figure A- 16)[30], qui possède des groupements donneur et accepteur fort, présente néanmoins une section efficace faible.

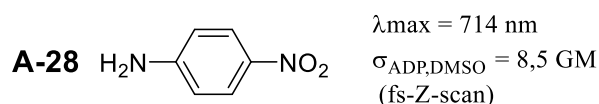


Figure A- 16 : Structure et propriétés d'ADP de la p-nitroaniline.

Au sein des différentes symétries, l'augmentation du système π conjugué permet d'améliorer les moments de transition dipolaire induisant une augmentation de la section efficace (Figure A- 17, Figure A- 18, Figure A- 19)[31]. Les systèmes π sont généralement constitués d'alternances de liaisons doubles/triples et simples et de cycles aromatiques : phényle, fluorène, imidazole, thiazole... Dans les dipôles, les dérivés **A-29**, **A-30** et **A-31** montrent une augmentation de 200 GM par double liaison ajoutée[32]. Les composés **A-32** et **A-33** suivent cette tendance lors d'ajout d'unité cyclopentadiène[33].

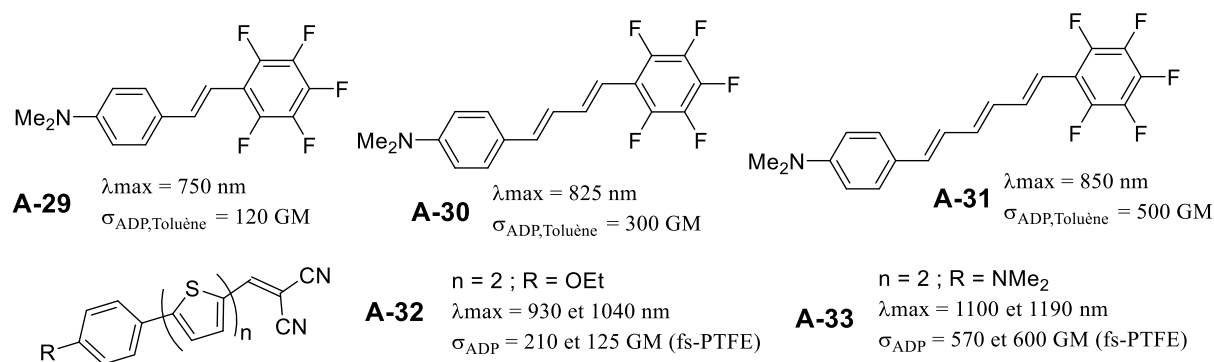


Figure A- 17 : Effet de la conjugaison sur la section efficace d'ADP dans les dipôles.

On observe que l'augmentation de la conjugaison, qui rapproche la HO et la BV ; induit un déplacement bathochrome. Dans les quadripôles (Figure A- 18) et les octupôles (Figure A- 19), le transfert de charge est aussi plus efficace quand il se fait sur une longue distance entre les groupements centraux et ceux en périphérie [18, 26, 34].

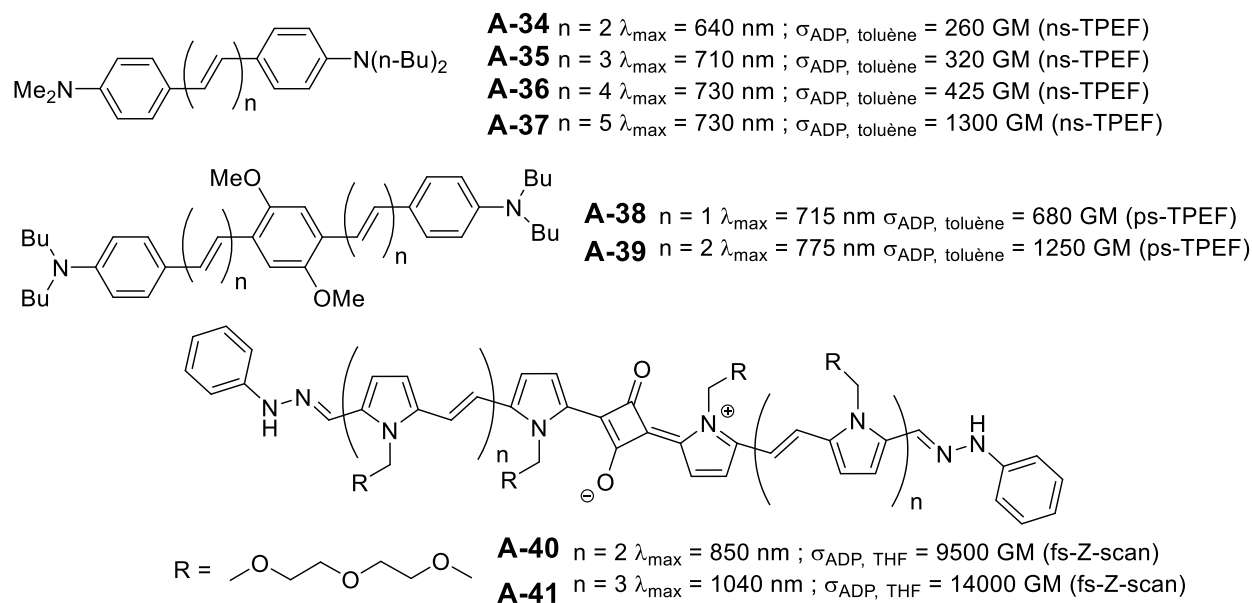


Figure A- 18 : Effet de la conjugaison sur la section efficace d'ADP dans les quadripôles.

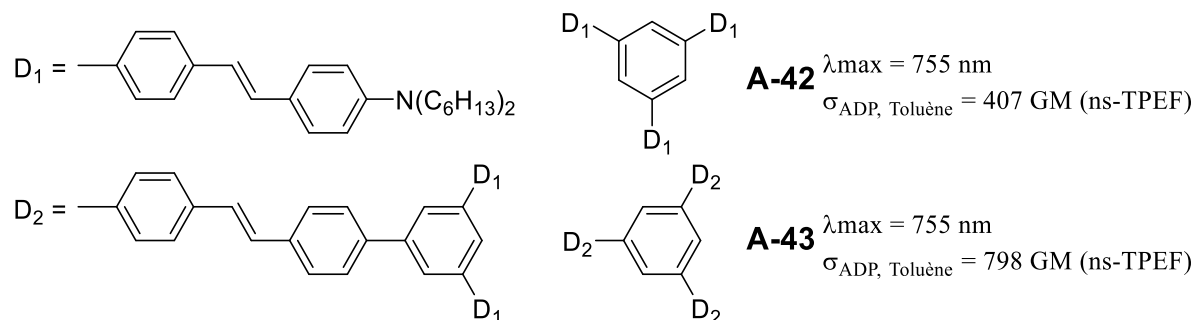


Figure A- 19 : Effet de la conjugaison sur la section efficace d'ADP dans les octupôles.

Limites de validité de la stratégie

Les phénomènes de distorsion

L'augmentation de la longueur du système π conjugué permet donc initialement d'augmenter la section efficace ; ce bénéfice est toutefois limité à des systèmes n'excédant pas une dizaine d'alternances simple-double liaison. Au-delà, des effets de distorsion du système π dits de Peierls[35], limitant l'efficacité du transfert électronique, interviennent généralement comme le montre l'exemple des molécules de la Figure A- 20.

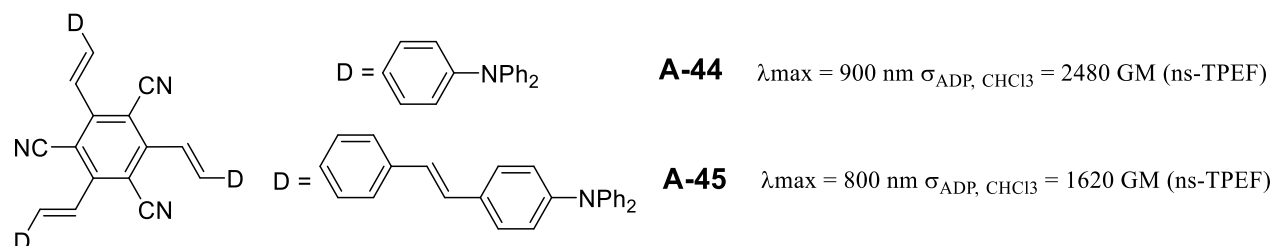


Figure A- 20 : Effet de distorsion sur la section efficace lors de l'augmentation de la longueur de conjugaison.

Par exemple sur les octupôles **A-44** et **A-45**, l'augmentation du nombre d'électrons π induit une baisse de la section efficace. Pour avoir une délocalisation étendue, la planéité et la rigidité des structures sont donc nécessaires[27]. Ainsi, l'ajout d'unité fluorène [36] permet de conjuguer efficacement l'augmentation du système π (mono-fluorène, oligomère, polymère) avec l'augmentation de la section efficace. Une meilleure délocalisation peut ainsi être obtenue en ayant des chromophores plans et rigides et une délocalisation dirigée.

Un exemple de l'importance de la linéarité du système conjugué est donné par les dipôles **A-46** à **A-49**. En fonction des branchements en para ou en méta, de fortes variations de section efficace sont observées. En cas de branchements méta, la délocalisation électronique est rompue et le transfert de charge moins efficace[37](Figure A- 21).

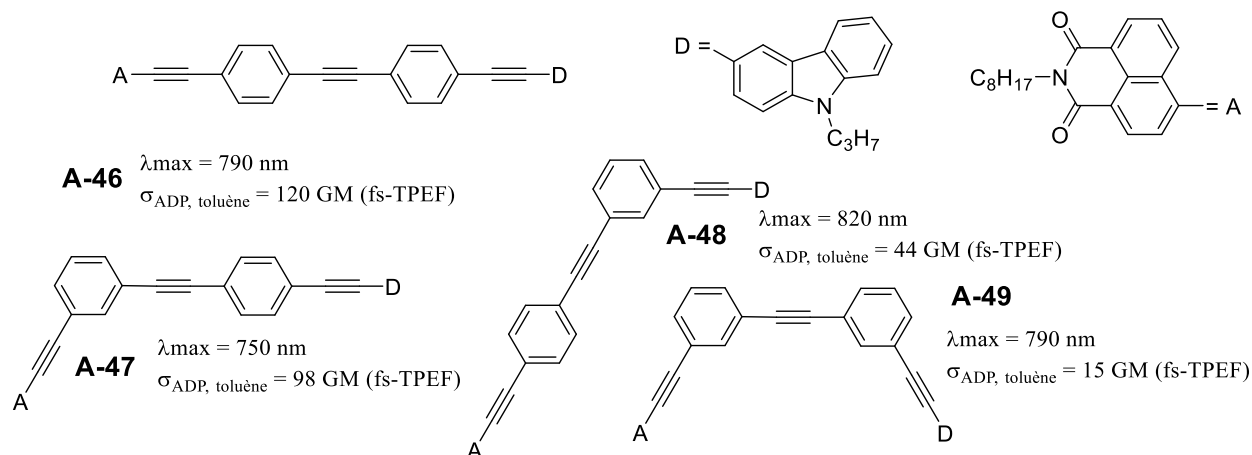


Figure A- 21: effet des branchements méta ou para porté par un groupement phényle sur la section efficace d'ADP.

Un autre exemple de l'importance de la rigidité a été montré par Blanchard-Desce et coll. La diminution des degrés de liberté comme les rotations entre les blocs du système π augmente la section efficace. Ainsi, en remplaçant un bloc bi-phényle permettant la libre rotation par un bloc dérivé du fluorène, la section efficace est pratiquement doublée (Figure A- 22)[38].

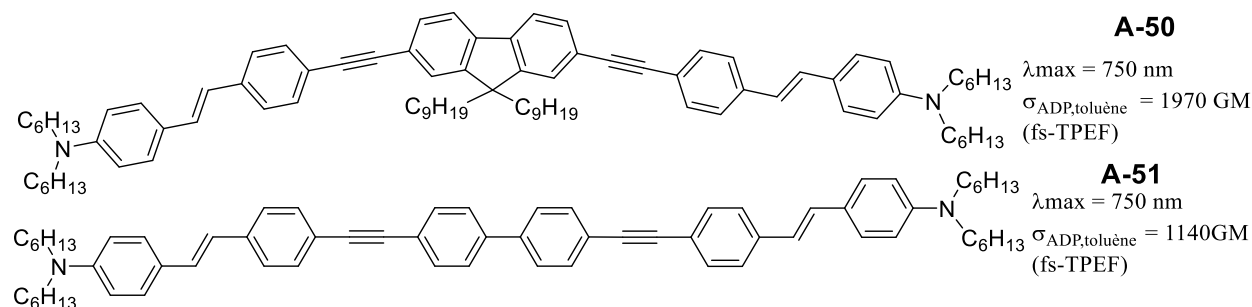


Figure A- 22 : Effet de la partie aromatique centrale sur des quadripoles.

Réactivité chimique

Le rapprochement du niveau énergétique des orbitales frontières HO-BV modifie la réactivité chimique de la molécule, notamment vis-à-vis de réactions d'oxydoréduction et de (photo)isomérisations. Selon l'application visée, ce phénomène pourra fortement limiter l'utilisation pratique du chromophore[39, 40]. Malheureusement les évolutions sont faiblement prédictibles.

II Evolutions d'une molécule dans un état excité

II.1) Contexte général

Une molécule se trouvant dans un état excité, que ce soit à la suite d'une absorption mono- ou multi-photonique, retourne spontanément vers un état énergétique plus stable. Ce retour se fait par dissipation d'énergie selon différents processus. Les principaux phénomènes conduisant à cette désexcitation sont décrits dans la Figure A- 23.

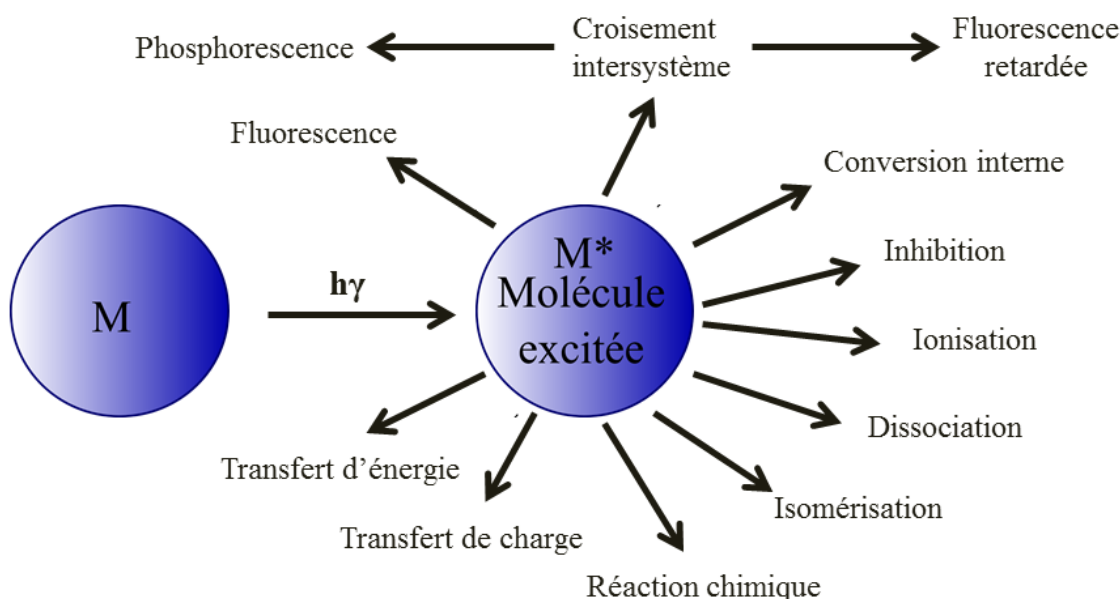


Figure A- 23 : désexcitation d'une molécule se trouvant dans un état excité.

On trouve différents types de phénomènes que l'on peut répartir en quatre groupes :

-Les phénomènes peuvent être destructifs, comme la dissociation, cas limite où l'énergie du photon est suffisante pour provoquer la rupture d'une liaison chimique. On peut aussi citer l'ionisation, où l'énergie du photon est suffisante pour arracher un électron à la molécule et former une espèce chargée.

-Des réactions photophysiques comme des réactions chimiques directes où l'irradiation lumineuse est nécessaire pour atteindre un état de haute énergie et réaliser une réaction impossible à partir de l'état fondamental ou encore les phénomènes d'isomérisation, peuvent également intervenir.

-Une autre classe regroupe les phénomènes non radiatifs comme le transfert d'électron photoinduit (formation d'un couple redox), le transfert d'énergie de l'état excité initialement peuplé par

irradiation vers de nouveaux états excités de façon intermoléculaire ou intramoléculaire (FRET, Transfert de Dexter), mais aussi l'inhibition ou « quenching ». Ce dernier terme recouvre l'ensemble des phénomènes qui induisent une désexcitation résultant de collisions intermoléculaires.

-Le quatrième groupe regroupe les phénomènes de luminescence.

Dans le cadre de cette thèse, un grand nombre de ces phénomènes sera pris en considération dans l'étude des processus photophysiques complexes intervenant à l'état excité. Nous porterons toutefois une attention particulière aux phénomènes de photoluminescence. La luminescence regroupe deux phénomènes distincts que sont la fluorescence et la phosphorescence. Même si historiquement la frontière entre ces deux phénomènes est floue, la distinction s'opère par le processus physico-chimique mis en jeu, la fluorescence intervenant par réémission du rayonnement absorbé entre deux états de même multiplicité de spin, la phosphorescence impliquant une conversion initiale vers un état intermédiaire de multiplicité de spin différente (généralement un état triplet).

II.2) Description de la luminescence : diagramme de Perrin-Jablonski

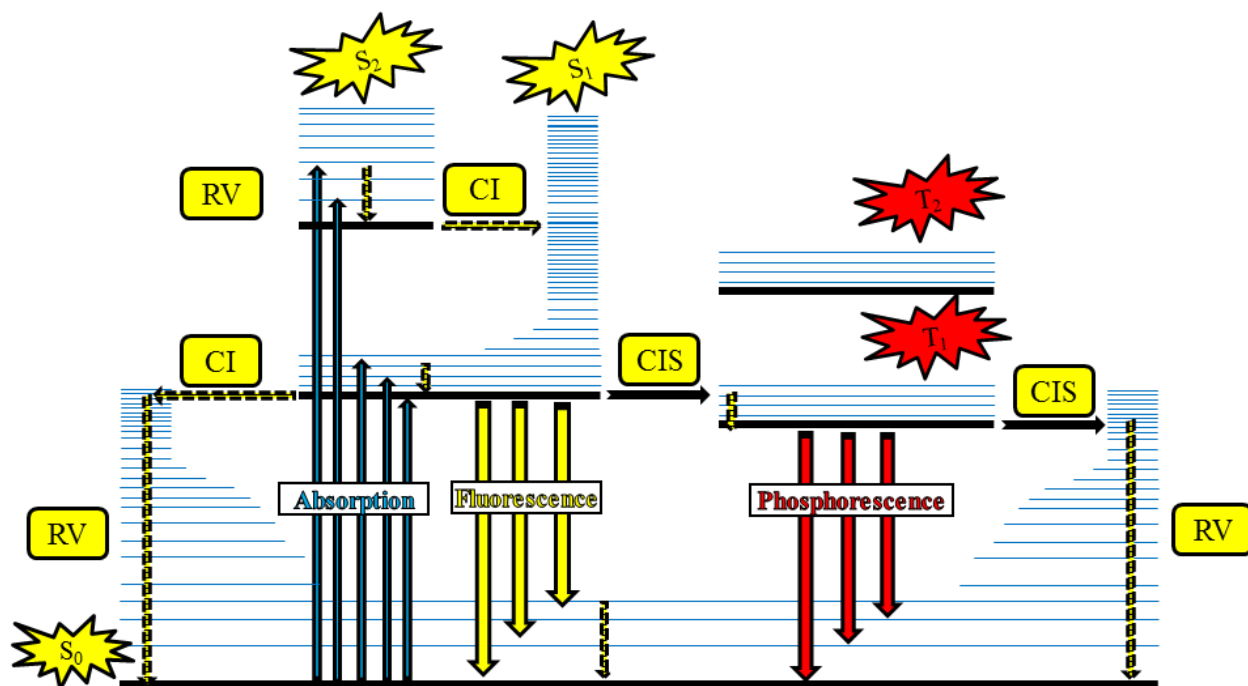


Figure A- 24 : Diagramme de Perrin-Jablonski.

L'ensemble des processus de luminescence peut être schématisé sous la forme d'un diagramme dit de Jablonski (Figure A- 24). Le nom de ce diagramme est un hommage au chercheur polonais Jablonski en reconnaissance de ses travaux sur les états excités[41]. Le **diagramme de Perrin-Jablonski** est un outil descriptif qui permet de visualiser les positions relatives des niveaux d'énergie d'une molécule et de tracer l'évolution énergétique entre les états excités. Les états excités représentés sont des états excités qui seront généralement de type singulet et triplet. Les états singulet ont un nombre de spin nul, ce qui signifie que les électrons sont tous appariés. Leur multiplicité de spin ($2S+1$) est alors égale à un, d'où le terme « singulet » représenté par la lettre S. Pour une multiplicité de spin donnée il existe différents états électroniques S_i , le numéro en indice indiquant sa position énergétique relative. L'état fondamental est noté S_0 , le premier état excité S_1 , le second S_2, \dots . Les états triplet notés T_1, T_2, \dots, T_n correspondent à des états excités où un couple d'électrons est non-apparié ce qui correspond à une multiplicité de spin de 3. A chaque état excité singulet est associé un état triplet d'énergie plus faible. Le diagramme de Jablonski permet de visualiser différents processus : l'absorption d'un photon, la relaxation vibrationnelle (RV), la conversion interne (CI), le croisement inter-système (CIS), la fluorescence et la phosphorescence. Les phénomènes de transfert énergétique peuvent aussi y être représentés. Il faut noter que l'état fondamental d'une molécule n'est pas forcément un état singulet (même si ce cas de figure est le plus général). La Figure A- 25 indique les temps caractéristiques des phénomènes associés à un tel diagramme. Dans ce diagramme deux grands types de processus de désactivation sont représentés :

- La désexcitation non radiative, processus durant lequel l'énergie acquise au cours de l'excitation est dissipée sous forme de vibration, rotation ou translation (flèche pointillée).
- La désexcitation radiative, processus durant lequel une molécule excitée convertit tout ou partie de l'énergie acquise en émettant un photon (flèche pleine).

Absorption : $10^{-15}s$
Relaxation vibrationnelle : $10^{-12}-10^{-10}s$
Durée de vie de l'état excité S_1 : $10^{-10}-10^{-7}s \rightarrow$ fluorescence
Croisement Inter-Système (CIS) : $10^{-10}-10^{-6}s$
Conversion interne (CI) : $10^{-11}-10^{-9}s$
Durée de vie de l'état excité T_1 : $10^{-6}-1s \rightarrow$ phosphorescence

Figure A- 25 : temps caractéristiques des différents processus décrits par le diagramme de Jablonski.

II.3) Discussion sur les phénomènes décrits par le diagramme de Perrin-Jablonski

II.3.a) Conversion interne (CI) et relaxation vibrationnelle (RV)

La conversion interne est une transition non radiative entre deux états iso-énergétiques de même multiplicité de spin. C'est donc une transition permise de spin. En solution, l'excès d'énergie vibrationnelle peut être transféré au solvant grâce aux collisions entre la molécule excitée et les différentes molécules de solvant environnantes. La conversion interne est toujours suivie d'une relaxation vibrationnelle vers l'état vibrationnel de plus basse énergie de l'état électronique considéré. Ainsi, si on atteint après excitation verticale le premier état électronique excité S_1 à un niveau vibrationnel $v' \neq 0$, on observe systématiquement une relaxation vibrationnelle vers ce même état S_1 , à son niveau vibrationnel fondamental $v=0$. Si on se trouve dans un état S_2 ou supérieur S_n , il y a une relaxation vibrationnelle vers le niveau S_n , $v=0$ puis conversion interne vers le premier état électronique puis relaxation vibrationnelle vers le niveau vibrationnel fondamental (loi empirique de Kasha). Dans les deux cas, les phénomènes conduisent au niveau vibrationnel 0 de l'état excité S_1 dans des temps de l'ordre de $10^{-12} - 10^{-10}$ secondes. La conversion interne de S_1 vers S_0 (ou désexcitation non-radiative) est possible mais moins efficace que les autres CI de S_n ($n > 1$) vers S_1 , en raison de la plus grande différence d'énergie entre les états électroniques S_1 et S_0 , la différence d'énergie entre deux niveaux jouant sur la vitesse de la CI. Par conséquent, la conversion interne de S_1 vers S_0 est concurrencée par de nouveaux phénomènes qui sont l'émission de photons (phénomène de fluorescence) et la conversion inter-système (passage à l'état triplet).

II.3.b) Croisement inter-système (CIS)

Le croisement inter-système est une transition non radiative iso-énergétique entre deux états vibrationnels d'états électroniques de multiplicité de spin différente. Cette transition est interdite de spin. De la même façon que la conversion interne, ce phénomène est suivi d'une relaxation vibrationnelle vers le niveau vibrationnel fondamental de l'état électronique considéré. Ce phénomène peut être suffisamment rapide ($10^{-7} - 10^{-9}$ s) pour entrer en compétition avec les autres voies de désexcitation à partir de S_1 (fluorescence et conversion interne). La violation de la règle de sélection de spin est rendue possible par le couplage spin orbite (couplage entre le moment

magnétique de spin et le moment magnétique orbitalaire). Les paramètres affectant la cinétique de ce croisement inter-système seront discutés plus en détail dans la section-C de ce premier chapitre.

II.3.c) Fluorescence

Lorsque la relaxation de S_1 à S_0 s'accompagne de l'émission d'un photon, on parle de fluorescence. Les caractéristiques de ce phénomène largement utilisé au cours de cette thèse sont présentées dans la suite de cette section. La fluorescence est soumise aux mêmes règles de sélection que l'absorption (équation d'Einstein). Nous ne discuterons ici que de la fluorescence en solution.

II.3.d) Phosphorescence

Lorsque la relaxation de T_1 à S_0 s'accompagne de l'émission d'un photon, on parle de phosphorescence. A température ambiante, du fait de l'interdiction de transition de spin, la désexcitation radiative est généralement faible, particulièrement pour les molécules organiques où le couplage spin orbite reste généralement modeste. Comme le processus est lent, de nombreuses collisions de la molécule à son état excité triplet avec les molécules de solvant peuvent avoir lieu, ce qui favorise le passage inter-système vers S_0 puis la relaxation vibrationnelle vers son état fondamental. Au contraire, si on inhibe les collisions (basses températures, milieu rigide), on diminue la possibilité de relaxations internes, ce qui est favorable à l'observation d'une phosphorescence. Le dégazage de la solution, qui permet de s'affranchir du dioxygène (dont l'état fondamental triplet constitue un piège particulièrement efficace pour l'état excité de la molécule), permet également de rallonger la durée de vie de l'état excité triplet de la molécule. Dans ces conditions, la durée de vie de cet état excité triplet peut être longue, ce qui permet d'observer la phosphorescence dans des temps de quelques microsecondes.

II.3.e) Phénomène de piégeage des états excités

On entend par phénomène de piégeage, les divers phénomènes collisionnels évoqués pouvant limiter la fluorescence. On peut citer les phénomènes collisionnels avec les atomes lourds (CBr_4) et les espèces paramagnétiques (O_2 , NO) qui dissipent l'énergie par vibration, les transferts d'électrons et de protons menant à des espèces chargées, la formation d'excimères et d'exciplexes qui modifient la nature du spectre de fluorescence. Le transfert de l'énergie de la molécule initialement excitée à son environnement est aussi possible. Comme nous le verrons par la suite, ces phénomènes de transfert d'énergie (radiatifs ou collisionnels) peuvent aussi être mis à profit, en particulier dans le cadre de la photothérapie dynamique.

Processus photophysiques et photochimiques	$M^* + Q \rightarrow \text{produits}$
Collisionnels	$M^* + Q \rightarrow M + Q + \text{chaleur}$
Transfert d'électron	${}^1M^* + Q \rightarrow M^{\cdot+} + Q^{\cdot-}$ ${}^1M^* + Q \rightarrow M^{\cdot-} + Q^{\cdot+}$
Transfert de proton	$MH^* + Q \rightarrow M^{+*} + QH^-$ $M^* + QH \rightarrow MH^- + Q^{+*}$
Excimère	${}^1M^* + {}^1M \rightarrow {}^1(MM)^*$
Exciplexe	${}^1M^* + Q \rightarrow {}^1(MQ)^*$ ${}^1Q^* + M \rightarrow {}^1(MQ)^*$
Transfert d'énergie	${}^1M^* + {}^1Q \rightarrow {}^1M + {}^1Q^*$ ${}^3M^* + {}^1Q \rightarrow {}^1M + {}^3Q^*$ ${}^3M^* + {}^3Q \rightarrow {}^3M + {}^3Q^*$

Tableau A- 3 : exemple de phénomène de piégeage de l'état excité.

III Caractéristiques du phénomène de fluorescence

Les concepts développés ici sont valables pour l'ensemble des phénomènes de luminescence mais seront spécifiquement discutés dans le cadre de la fluorescence.

III.1) Le déplacement de Stokes

La fluorescence a généralement lieu à partir de l'état S_1 (règle de Kasha) et en conséquence les caractéristiques d'émission ne dépendent pas de la longueur d'onde d'excitation dans la bande d'absorption $S_0 \rightarrow S_1$. Le principe de conservation de l'énergie implique que le spectre de fluorescence corresponde à des énergies plus faibles et donc à des longueurs d'onde plus grandes que l'absorption. Cela s'explique par la perte énergétique lors de la relaxation vibrationnelle vers

l'état $v=0$ de S_1 . Dans le cas de spectres présentant une structure vibronique, l'écart d'énergie entre les états vibrationnels est du même ordre de grandeur à l'état S_0 et S_1 (et est lié au type de vibration impliquée dans la transition par la loi de Hooke). La transition électronique intervenant au cours de la fluorescence est un phénomène rapide au même titre que l'absorption, on peut donc utiliser le principe de Franck-Condon. Ces deux constats permettent de justifier l'observation d'une symétrie entre spectre d'absorption et spectre de fluorescence en fonction de l'environnement du système (gaz et/ou apolaire). Cette symétrie est désignée sous le terme d'effet miroir. Comme le processus le plus probable en absorption est $(S_0, v=0) \rightarrow (S_1, v' \neq 0)$, on a $\lambda_{max}^{abs} \neq \lambda_{max}^{em}$. L'allure du spectre dépend aussi des conditions expérimentales (solvant utilisé par exemple) et de la réorganisation électronique à l'état excité. On appelle déplacement de Stokes l'écart en nombre d'onde entre le maximum de fluorescence et le maximum de la bande d'absorption (Figure A- 26). Il est exprimé en cm^{-1} .

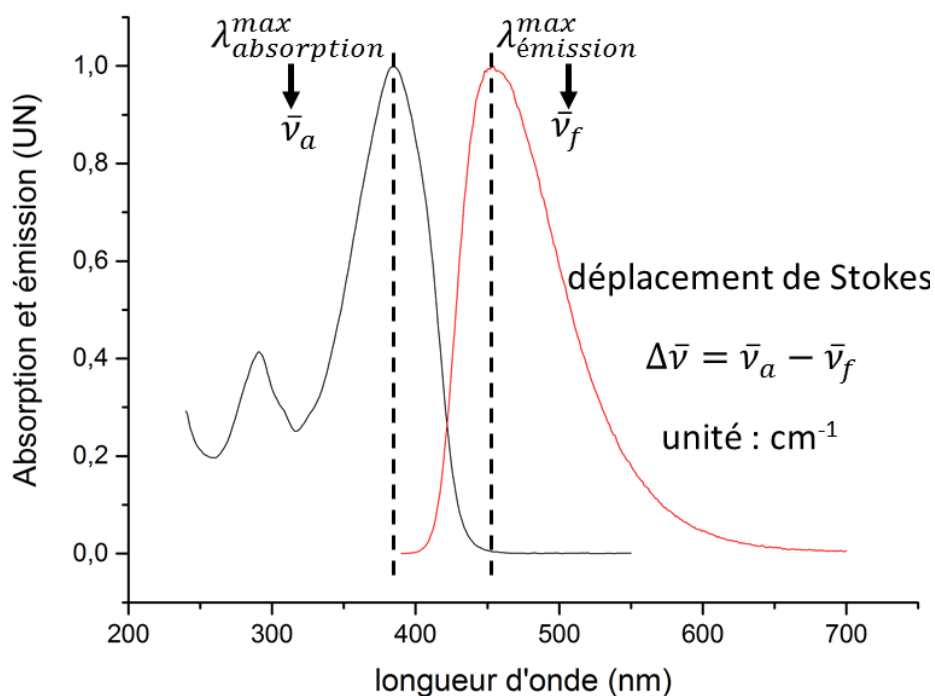


Figure A- 26 : définition du déplacement de Stokes.

III.2) Rendement quantique de fluorescence

Ce terme désigne le rapport entre le nombre photons émis et le nombre de photons absorbés par la molécule. Il peut s'exprimer en fonction des constantes cinétiques des différents processus intervenant à l'état excité selon :

$$\Phi_F = \frac{k_r^s}{k_r^s + k_{nr}^s}$$

Équation A- 11

avec :

- k_r^s la constante de vitesse d'émission radiative à partir de S_1 (fluorescence),
- k_{nr}^s la somme des constantes de l'ensemble des processus non-radiatifs issus de S_1 .

L'ensemble de ces processus cinétiques, et donc le rendement quantique de fluorescence dépendent de différents paramètres liés à la fois à l'environnement, en particulier au solvant (polarité, viscosité, proticité,...), et aux conditions expérimentales (température, pression). Il existe deux grands types de méthode pour déterminer le rendement quantique de fluorescence : les méthodes de mesure absolue et les méthodes relatives (annexe n°2) [42]

III.3) Temps de vie de luminescence

La durée de vie de fluorescence est définie comme la durée nécessaire au retour de la moitié des molécules excitées vers l'état fondamental S_0 (annexe n°2). Le temps moyen de fluorescence est généralement de l'ordre de la dizaine de nanosecondes[43]. Ce temps s'exprime sous la forme de :

$$\tau_s = \frac{1}{(k_r^s + k_{nr}^s)} = \frac{\Phi_F}{k_r^s}$$

Équation A- 12

Les décroissances observées sont généralement de type mono ou multi-exponentielles. Elles dépendent de la nature des états électroniques excités et de leur nombre, ainsi que des phénomènes de désexcitation autres que la fluorescence.

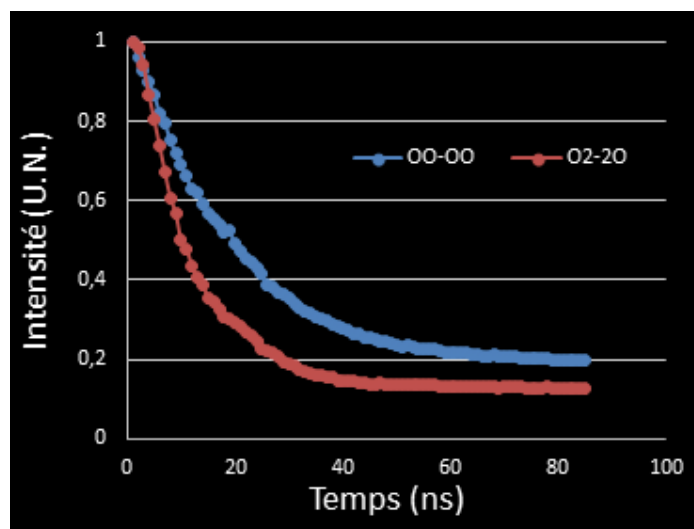


Figure A- 27 : Décroissance mono-exponentielle de composé étudié au chapitre 2.

Pour certains chromophores le temps de vie de fluorescence reste inchangé en fonction des conditions (solvants, polarité, proticité, viscosité, pH). D'autres, au contraire, sont sensibles à ces variations, ce qui peut être utilisé dans un cadre d'imagerie FLIM (Fluorescence Life-time Imaging Microscopy)[44, 45]. Un exemple de capteur de la polarité imagé par méthode FLIM montre l'intérêt d'une telle imagerie (Figure A- 28)[46]. Dans cet exemple, la variation de durée de vie de luminescence de la molécule, dépendante de la polarité, est retranscrite en niveaux de couleurs permettant de « cartographier » les environnements de polaire au sein de la cellule.

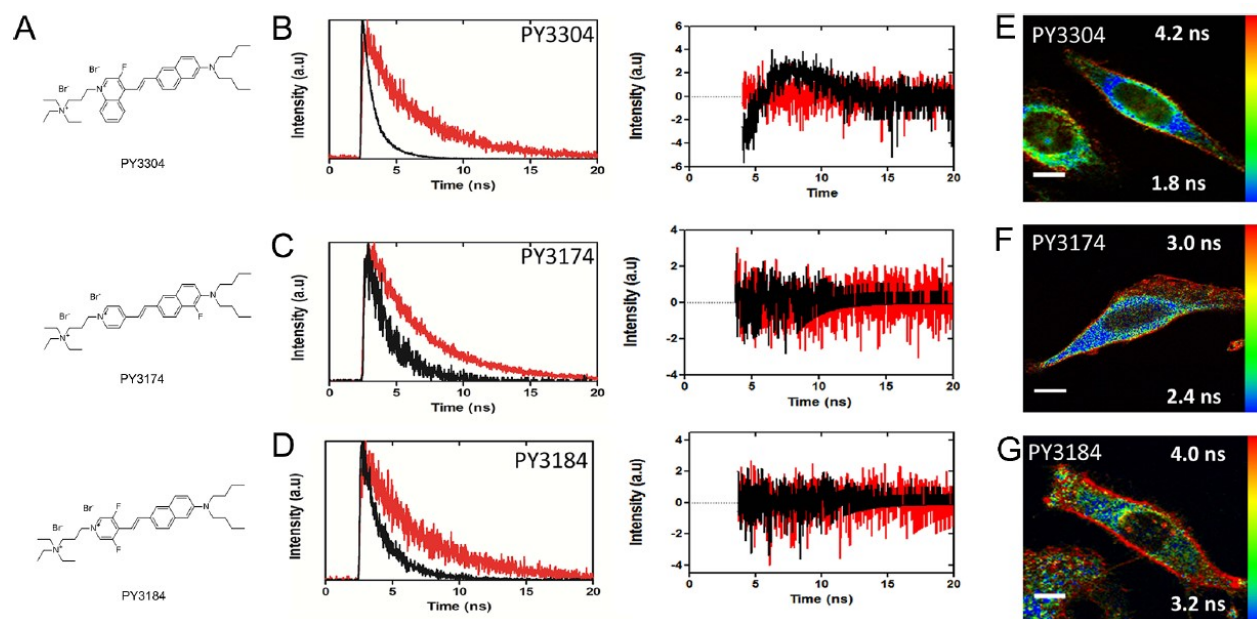


Figure A- 28 : Exemple de molécule et des variations de τ_f en fonction de l'environnement cellulaire[46].

De la même façon, on peut déterminer la durée de vie (ou temps de demi-vie) de phosphorescence qui s'exprime sous la forme :

$$\tau_T = \frac{1}{(k_r^T + k_{nr}^T)}$$

Équation A- 13

III.4) Le solvatochromisme

Le solvatochromisme est l'influence des paramètres de solvation d'une molécule sur ses propriétés spectrales[47]. L'énergie d'une transition électronique dans le vide est $E=E_1-E_0$ où E_0 représente l'énergie de l'état fondamental (S_0) et E_1 celle de l'état excité (S_1) au niveau vibrationnel atteint par transition de Franck-Condon. En solution, la présence d'interactions (spécifiques ou non spécifiques) entre la molécule et le solvant va modifier les niveaux énergétiques des états électroniques de la molécule. Les différences de polarité des solvants, liées à des constantes diélectriques et indices de réfraction différents, vont entraîner des différences de stabilisation de ces états. De manière générale, plus l'indice de réfraction augmente plus on stabilise les niveaux d'énergies E_0 et E_1 (dépendance du mouvement des électrons au sein des molécules de solvant). On observe la même évolution avec l'augmentation de la constante diélectrique (réorientation des dipôles). L'énergie du premier niveau excité est maintenant $E_1'=E_1+\Delta E_1$ et celle du niveau fondamental $E_0'=E_0+\Delta E_0$ où ΔE_0 et ΔE_1 sont les énergies de stabilisation des états fondamental et excité. Dans le cas où la molécule possède un moment dipolaire différent à son état fondamental et à son état excité $\mu^* > \mu$, il en découle une stabilisation différente des états E_1 et E_0 , et cette différence varie avec la polarité des solvants utilisés (Figure A- 29).

De fait, lorsque $\mu^* < \mu$, on observera un solvatochromisme négatif correspondant à un déplacement hypsochrome des bandes d'absorption et d'émission du composé lorsque la polarité du solvant augmente. Inversement, lorsque $\mu^* > \mu$ (solvatochromisme positif), on observe un déplacement bathochrome des différentes bandes.

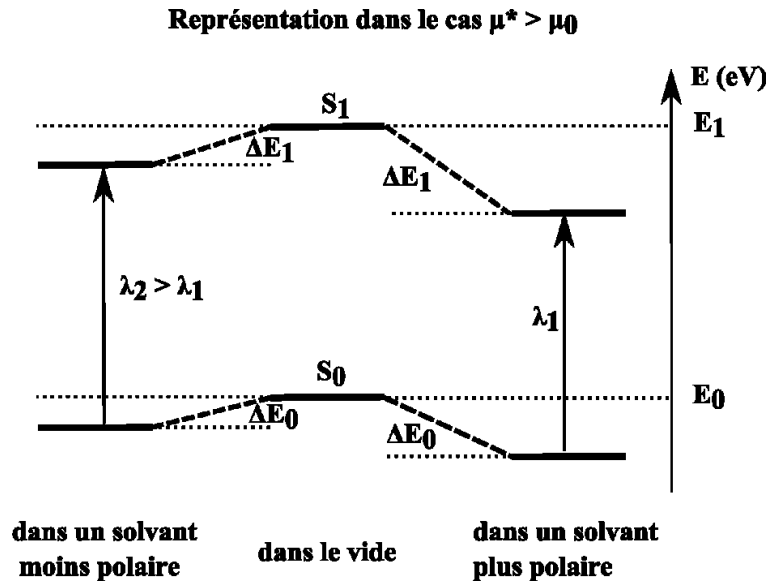


Figure A- 29 : Effet du solvatochromisme positif sur la longueur d'onde d'absorption.

Cette analyse correspond au cas le plus simple où le solvant peut être traité comme un continuum diélectrique entourant la molécule. Pour certains composés, il faut aussi tenir compte des interactions spécifiques (exemple : liaisons hydrogènes)[48], ce qui rend l'analyse des effets de solvant plus difficiles. Le modèle de Lippert-Mataga permet, à partir des moments dipolaires de l'état fondamental μ_{S_0} et de l'état excité μ_{S_1} , de relier le déplacement de Stokes aux propriétés du solvant pour les dipôles (Équation A- 14)[49-51].

$$v_{abs} - v_{em} = \frac{2(\mu_{S_1} - \mu_{S_0})^2}{cha^3} \left[\frac{2(\epsilon_s - 1)}{(2\epsilon_s + 1)} - \frac{2(n^2 - 1)}{(2n^2 + 1)} \right] + cst = \frac{2(\mu_{S_1} - \mu_{S_0})^2}{cha^3} \Delta f + cst$$

Équation A- 14

avec :

- v_{abs} et v_{em} les nombres d'onde d'absorption et d'émission,
- n l'indice de réfraction du solvant,
- ϵ_s constante diélectrique du solvant,
- μ_{S_0} et μ_{S_1} les moments dipolaires à l'état fondamental et à l'état excité,
- c la célérité de la lumière,
- h la constante de Planck,
- Δf polarisabilité d'orientation,
- a le rayon d' Onsager(rayon hydrodynamique de la molécule).

L'utilisation du modèle Lippert-Mataga peut permettre, à partir des données du solvatochromisme, de calculer les moments dipolaires de nombreux chromophores (Figure A- 30). Cependant ce

modèle a des limites et ne marche pas de manière optimale pour les composés quadripolaires ou, dans notre cas, pour des chromophores fonctionnalisés par des polymères hydrosolubilisants, dont le repliement induit des effets de polarité qui peuvent compenser ceux dûs au solvant.

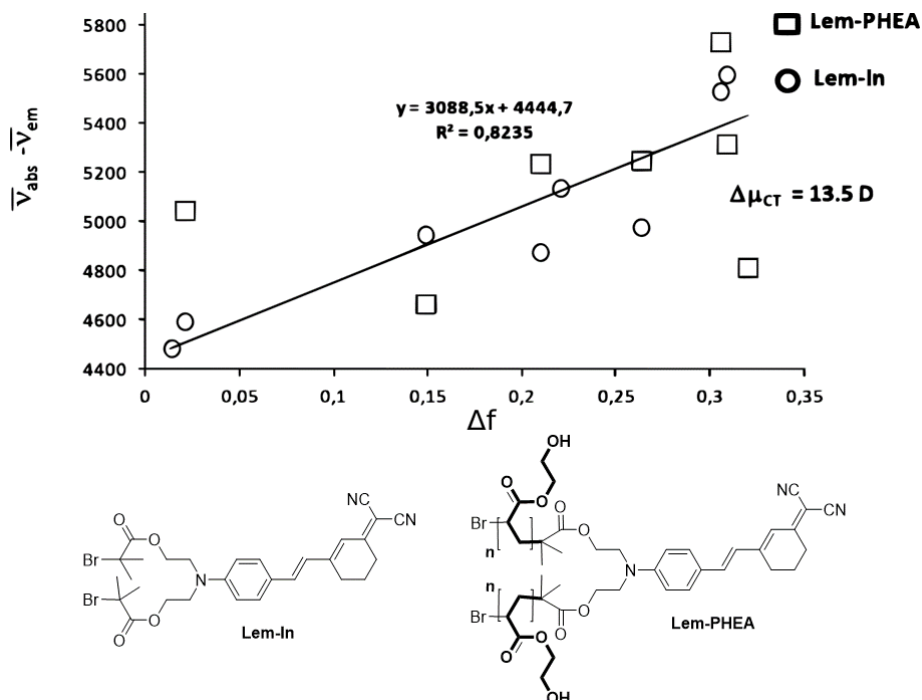


Figure A- 30 : Courbe de Lippert-Mataga pour les dérivés Lem-In et Lem-PHEA[52].

III.5) Cahier des charges spectroscopique

L'ensemble des paramètres décrits ci-dessus devront être pris en considération en fonction des applications visées dans le cadre de cette thèse. Un chromophore sera décrit par l'étude des différents paramètres évoqués qui sont rappelés ici :

- Longueur d'onde d'absorption et d'émission λ_{max}^{abs} et λ_{max}^{em} ,
- Rendement quantique de fluorescence ϕ_F ,
- Coefficient d'extinction ϵ ,

ces deux termes permettant de calculer son paramètre de brillance $f = \phi_F * \epsilon$,

- Temps de vie de fluorescence τ_F ,
- Efficacité quantique de croisement inter-système (se traduisant par un haut rendement de génération d'oxygène singulet, s'il peut être généré),
- Absence de photoblanchiment.

Chapitre n°1-section B - Imagerie de fluorescence

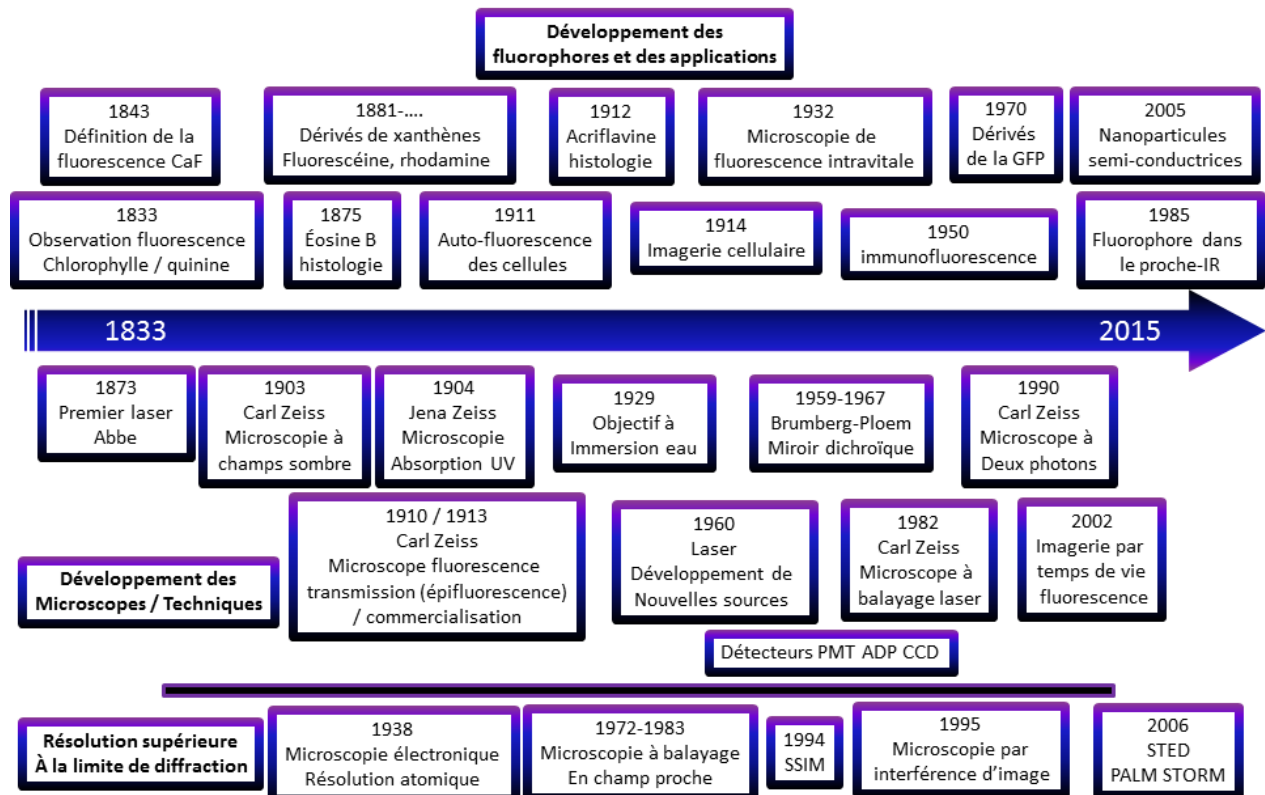


Figure B- 1 : Développement de la fluorescence : chromophores et applications.

Le perfectionnement continu des systèmes optiques, des dispositifs de traitement d'image et des sondes fluorescentes permettant d'imager sélectivement des biomarqueurs et des organes[53, 54] a fait de la microscopie de fluorescence un outil indispensable en recherche biomédicale. La capacité d'une molécule à jouer le rôle d'agent de contraste sera déterminée par plusieurs paramètres :

- La brillance qui va définir l'intensité du contraste. Plus la brillance est grande, plus le signal sera intense et pourra être collecté en profondeur.
- Les longueurs d'onde d'absorption et d'émission : plus elles seront décalées vers le rouge ou proche IR, plus les photons incidents (émis) pourront pénétrer (être détectés) profondément dans l'échantillon.

- Le déplacement de Stokes : plus il est important, moins on observera de phénomènes de réabsorption par le chromophore de sa propre fluorescence, et plus il sera facile de différencier le photon émis par le fluorophore excité d'un photon diffusé en provenance de la source.

A ces paramètres spectroscopiques se rajoutent des paramètres pratiques tels que la solubilité de la sonde en milieu physiologique, sa biocompatibilité, sa capacité à pénétrer les membranes et/ou à s'accumuler dans des compartiments spécifiques de la cellule de l'organisme imagé.

I Microscopie de fluorescence

I.1) Principe de l'imagerie de fluorescence (épi-fluorescence)

Il s'agit d'une microscopie permettant de récolter la fluorescence différente de celle par transmission (Figure B- 2). La source est généralement une lampe à xénon ou à mercure couplée à un système de filtre (monochromateur) permettant de sélectionner les longueurs d'onde excitatrices. La lumière incidente est réfléchiée sur l'échantillon via un miroir dichroïque. Alternativement, l'excitation peut être aussi intrinsèquement monochromatique via l'utilisation de lasers. Les photons émis par l'échantillon passent à travers un miroir dichroïque et un filtre passe-bas, permettant d'éliminer la lumière incidente. Le signal lumineux parvenant à l'objectif du microscope est enfin focalisé via un jeu de lentille pour être détecté via une caméra CCD.

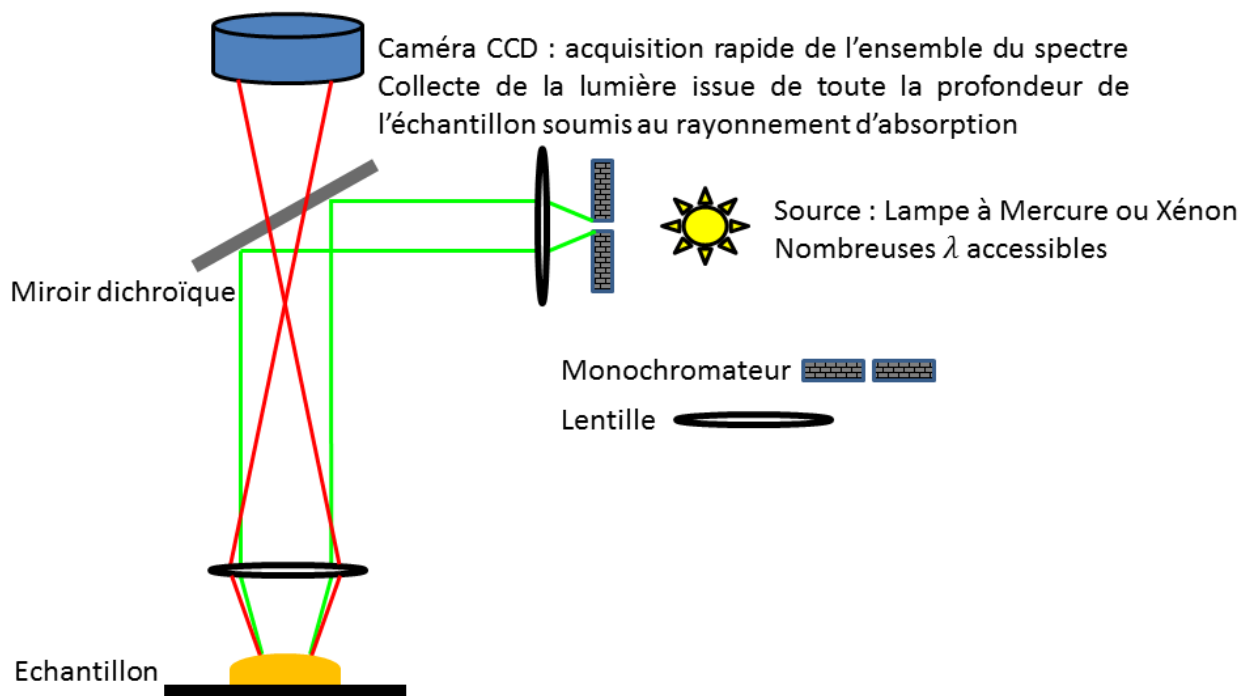


Figure B- 2 : Microscopie de fluorescence.

Cette méthode permet de récolter l'ensemble de la luminescence issue de l'ensemble de l'échantillon et est, de ce fait limitée aux échantillons monocouche. Afin de permettre une résolution au plan focal d'un échantillon épais, en éliminant les photons non-issus de ce plan focal, la microscopie confocale s'est imposée comme une alternative très avantageuse.

I.2) La microscopie confocale

Cette technique est basée sur l'utilisation d'un point source illuminé (lumière sortante du diaphragme d'illumination) et focalisé sur un point limité dans l'échantillon[53]. Il permet de sélectionner un plan focal. Les lentilles et le diaphragme de sortie permettent de sélectionner exclusivement la lumière émise issue du plan focal, en éliminant l'émission résultant de l'excitation au-dessus ou en dessous de ce même plan, mais cette résolution est obtenue au prix d'une perte de signal conséquente (Figure B- 3).

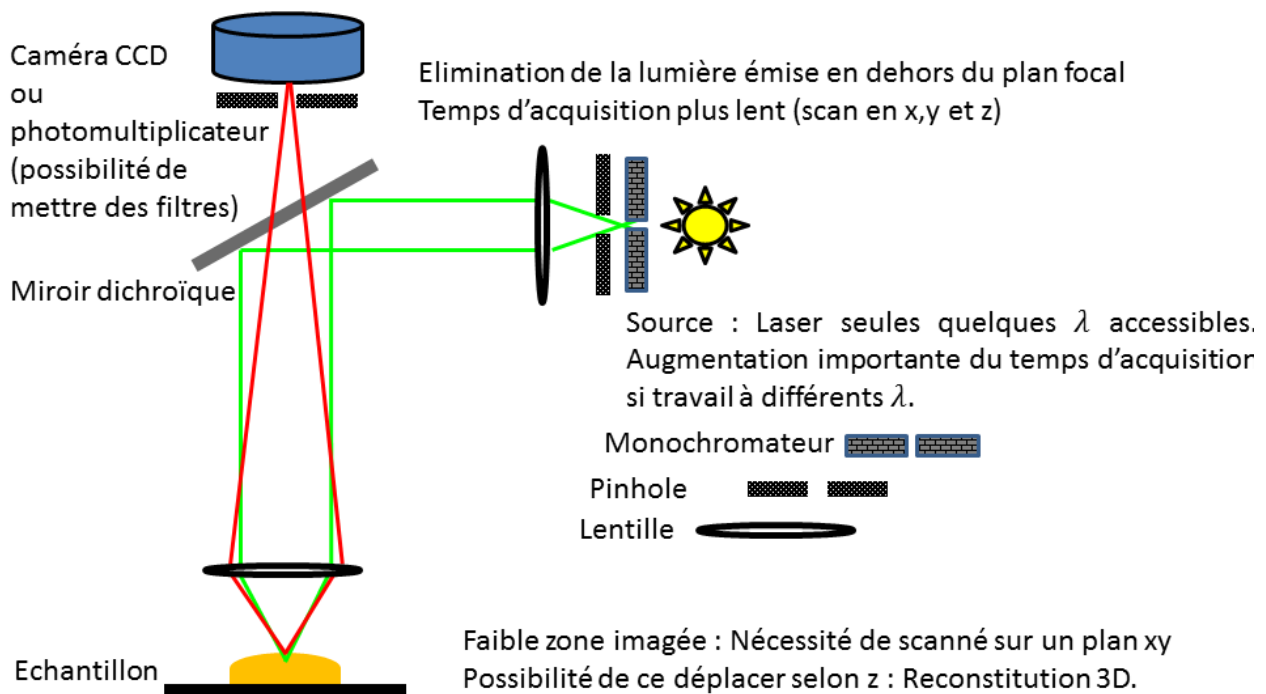


Figure B- 3: Microscopie de fluorescence confocale.

Pour faire une image d'un plan, il faut se décaler en xy et pour arriver à une image 3D, il faut refaire les mêmes expériences avec un déplacement en Z (Figure B- 4). Ces méthodes de scanning sont automatisées mais sont assez lentes, surtout si l'image nécessite l'utilisation de différents canaux lasers. Les microscopes modernes, par un jeu de miroirs et de lentilles, permettent d'irradier simultanément une surface du plan xy. La résolution maximale est de 200nm selon le plan xy et de 600nm selon z. Cette résolution est suffisante pour de nombreuses expériences *in cellulo* ou *in vivo*.

Malgré ces nombreux avantages, cette technique souffre de nombreuses limitations. La principale tient au fait que le signal utile n'est obtenu que par les photons passant par le diaphragme, donc ne subissant ni diffusion ni déviation. Ce phénomène limite considérablement la collecte de la fluorescence, ce qui limite fortement la profondeur accessible par cette technique d'imagerie et diminue considérablement le rapport signal/bruit.

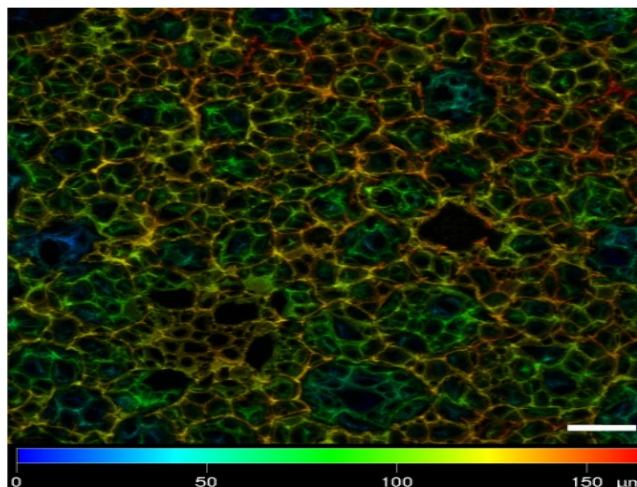


Figure B- 4 : Reconstitution de la profondeur d'un marqueur cellulaire (Alvetex®) grâce à différente teinte de couleur.

I.3) Optimisation des propriétés spectroscopiques

Pour l'imagerie cellulaire, il faut optimiser la brillance. Nous allons discuter ici des techniques permettant d'agir sur l'efficacité de génération de fluorescence. Pour éviter les phénomènes de réabsorption et distinguer aux mieux les photons collectés des photons incidents, nous regarderons aussi comment optimiser le déplacement de Stokes.

I.3.a) Optimisation du rendement quantique de fluorescence

La fluorescence est généralement générée par des centres aromatiques ou hétéroaromatiques. Si nous reprenons l'étude des constantes cinétiques, nous cherchons à maximiser k_r par rapport à k_{nr} . Pour cela, la position des niveaux énergétiques est importante. En effet, plus les niveaux S_1 et S_0 sont proches, plus la probabilité de conversion interne de $S_{1,v=0}$ vers $S_{0,v \neq 0}$ est élevée. Ce phénomène connu sous le nom de loi du fossé énergétique (traduction de energy gap law), dans le cas des molécules dont l'émission est décalée dans le rouge, est un facteur limitant de l'accroissement des longueurs de conjugaison. Le second point pour maximiser le rendement de fluorescence est de limiter la dissipation d'énergie par vibration. Pour cela il faut des systèmes rigides. La structure rigide du chromophore permet de diminuer les phénomènes non radiatifs.

I.3.b) Optimisation du déplacement de Stokes

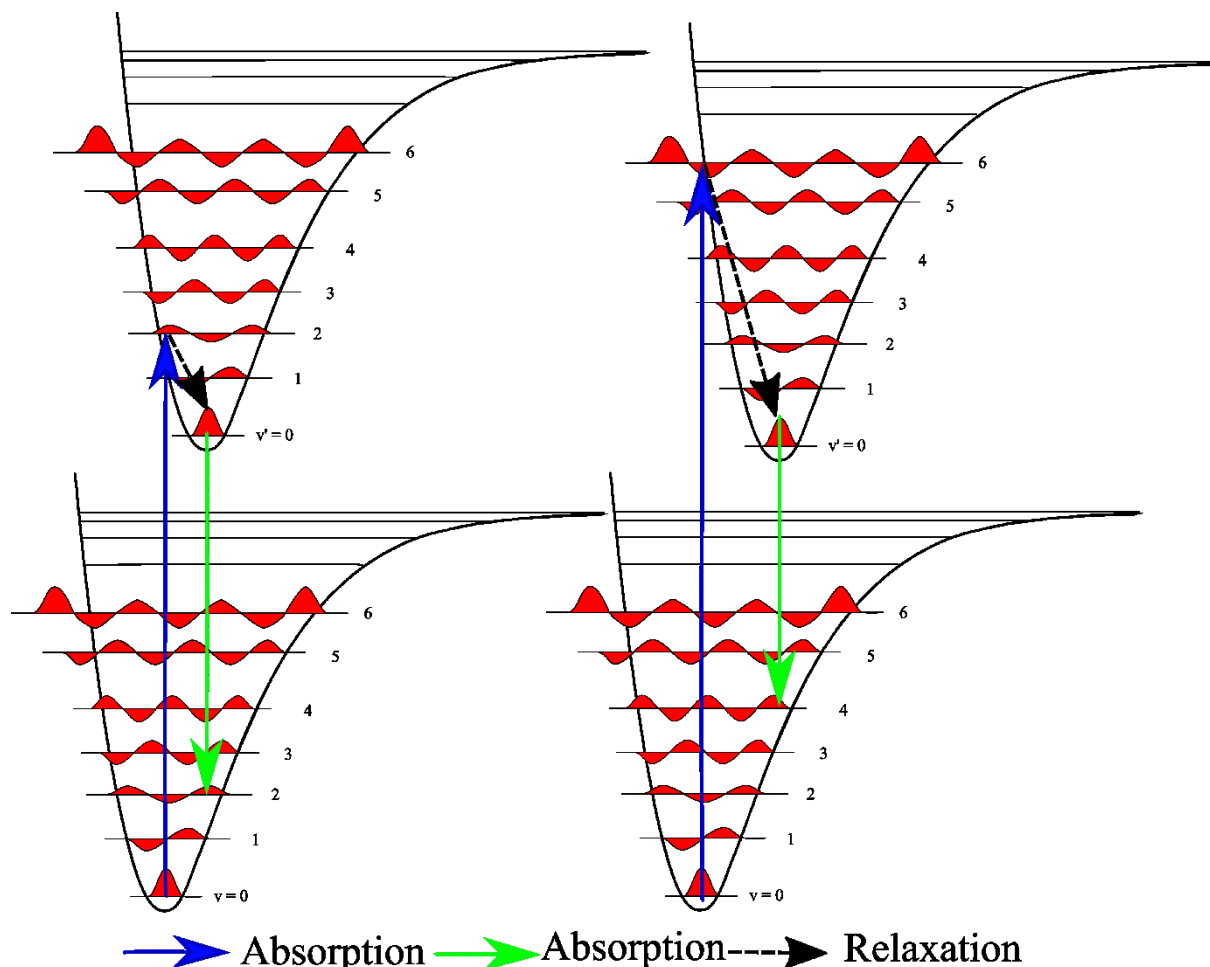


Figure B- 5 : Exemple de l'effet de la géométrie de l'état excité sur le déplacement de Stokes.

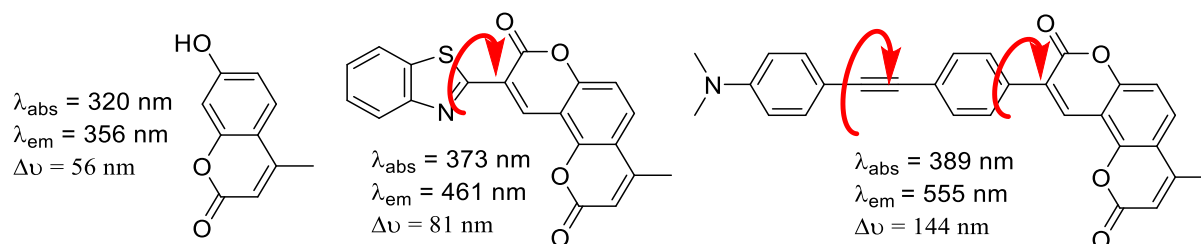


Figure B- 6 : Exemple de l'effet de la conjugaison sur le déplacement de Stokes.

L'augmentation de la longueur du système π a un effet bathochrome sur l'absorption et l'émission. Cependant le déplacement de Stokes n'est pas systématiquement augmenté par l'augmentation de la conjugaison. En effet, le déplacement de Stokes est principalement lié à la relaxation géométrique entre l'état fondamental et l'état excité[55]. L'introduction de liaisons permettant des libres rotations permet d'avoir des différences de stabilisation à l'état excité et à l'état fondamental occasionnant de fortes relaxations (Figure B- 6). Des ruptures de symétrie permettent aussi

d'apporter des distinctions énergétiques entre l'état S_0 et l'état S_1 (Figure B- 7)[56]. Une autre stratégie consiste à créer un transfert de charge intramoléculaire ICT provoquant un changement de moment dipolaire entre l'état fondamental et l'état excité (Figure B- 7)[57]. Cette stratégie a ainsi été utilisée pour augmenter le déplacement de Stokes de cyanines[58], molécules dont la transition solitonique se caractérise généralement par un très faible déplacement.

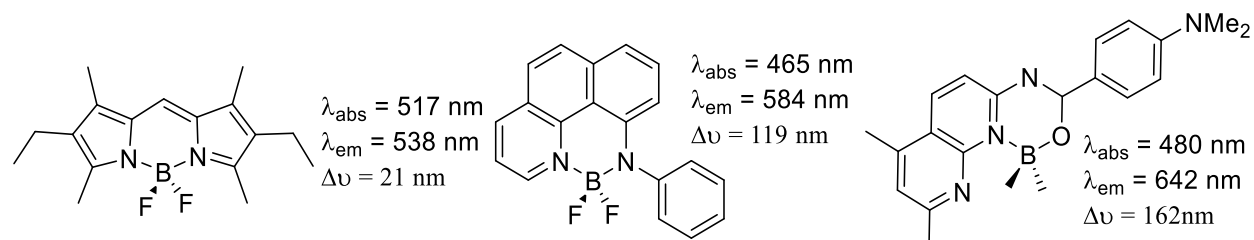


Figure B- 7 : exemple de l'effet de dissymétrie de BODIPY.

Deux types de transfert de charge intramoléculaire sont distingués : les ICT plan et distordu nommés respectivement Planar Intramolecular charge transfer PICT et Twisted Intramolecular charge transfer TICT[50, 59-64]. Le PICT, simplement nommé ICT, correspond à l'apparition d'une forme limite résonante de type quinoïdal. Les états sont fortement polaires et permettent d'expliquer le fort solvatochromisme. Le TICT est dû à une rotation entre la partie donneur et la partie accepteur d'un chromophore fortement délocalisé. Les états sont opposés à l'état excité localisé (EL) qui ne présente pas de caractère de type transfert de charge. Les distorsions de l'état fondamental sont une des stratégies utilisées pour provoquer un ICT[65].

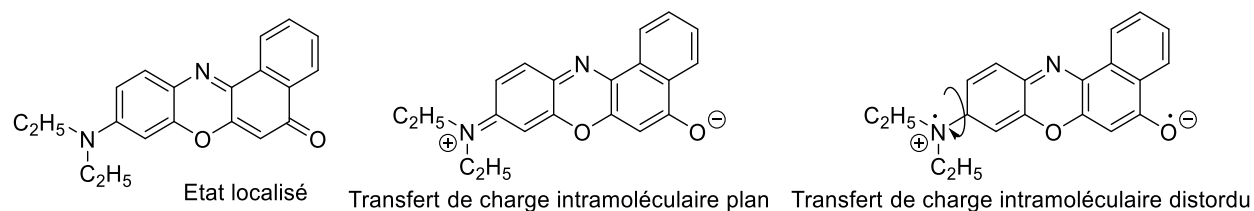


Figure B- 8 : Différence entre état localisé et transfert de charge intramoléculaire plan ou distordu.

D'autres phénomènes comme la formation d'excimère, exciplexe, le FRET, le transfert de proton à l'état excité peuvent également permettre d'augmenter le déplacement de Stokes[66].

II Exemples de chromophores pour l'imagerie

La gamme de molécules utilisées comme chromophores pour la microscopie de fluorescence est extrêmement large et en constante expansion. La Figure B- 9 reporte ainsi la brillance en fonction de la longueur d'onde d'excitation pour une série de chromophores[67]. Une distinction peut tout d'abord être faite entre fluorophore intrinsèque et fluorophore extrinsèque. Après avoir brièvement évoqué les premiers, nous verrons comment les travaux constants d'ingénierie moléculaire sur les seconds ont permis de développer des gammes de chromophores aux caractéristiques spectroscopiques contrôlables à volonté. Nous aborderons plus particulièrement la question de l'imagerie *in vivo* et les contraintes particulières requises par ce type d'imagerie.

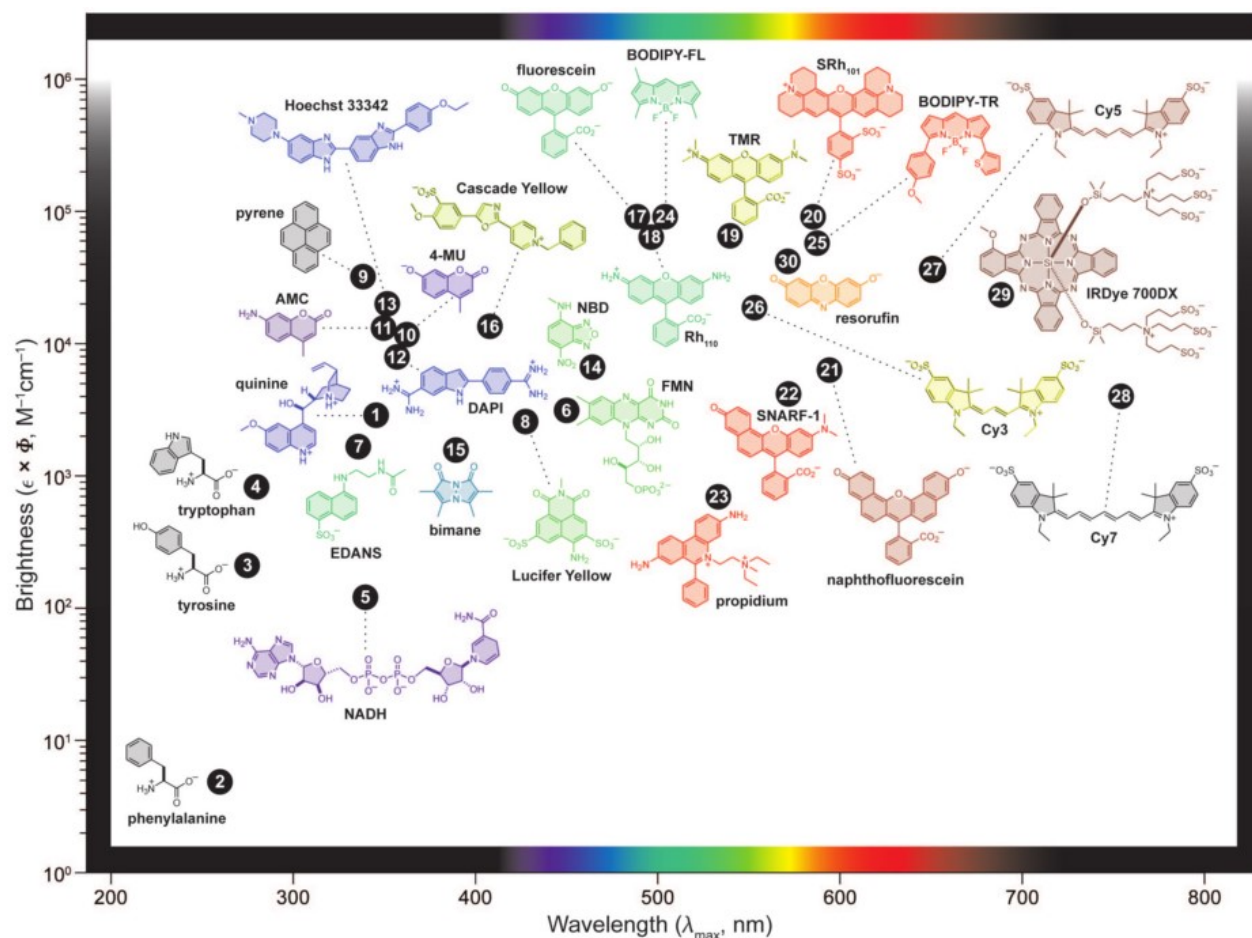


Figure B- 9 : Exemples de brillance de chromophores en fonction de la longueur d'onde d'absorption, la longueur d'onde d'émission correspond à la couleur dans laquelle est dessinée chaque molécule[67].

II.1) Fluorescence intrinsèque

Un certain nombre de composés naturels sont fluorescents. On parle de fluorescence intrasèque. C'est particulièrement le cas des composés présentant des groupements aromatiques, dont on trouve de nombreux exemples en biologie. Les premiers d'entre eux sont les acides aminés : le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine. L'étude de leur fluorescence a permis d'étudier la conformation de nombreuses protéines, et d'imager des tissus comportant ces protéines[68]. D'autres molécules biologiques sont fluorescentes on peut citer : NADH, FAD, le pyroxyde phosphate,... Ces molécules possèdent le plus souvent des rendements de fluorescence modestes et une absorption/émission dans la gamme UV-bleu, fortement absorbée et diffusée par les milieux physiologiques, ce qui les rend peu adaptés à l'étude d'échantillons épais, *a fortiori* à de l'imagerie *in vivo* comme nous allons le voir.

II.2) Exemples de marqueurs

Le marquage sélectif des différents compartiments cellulaires et tissus biologiques constitue un objectif important dans l'ingénierie moléculaire des sondes fluorescentes, car il permet de réaliser des images polychromes contrastées des échantillons vivants. En plus de posséder de bonnes propriétés spectroscopiques, les chromophores utilisés dans ce cadre doivent posséder des propriétés physicochimiques leur permettant à la fois de franchir les différentes membranes biologiques séparant le milieu extérieur du compartiment cible et d'être impliqué dans des interactions spécifiques avec des constituants (ADN, protéines,...) propres à ce dernier. Quelques exemples de marqueurs sont regroupés dans cette partie. Un grand nombre de marqueurs sont commercialement disponibles[69].

Le noyau de la cellule, particulièrement son ADN peut ainsi être marqué par les composés DRAQ5, DAPI ou de la famille Hoechst. Ces composés sont tous aromatiques et possèdent des groupements ammoniums, permettant une association optimisée par interaction avec les groupements phosphates de l'ADN. Ces chromophores, qui se distinguent par des caractéristiques intercalations différentes dans l'ADN (sillon mineur ou majeur, séquence) seront utilisés au cours du chapitre 4. D'autres marqueurs marquent sélectivement les mitochondries (MitoTracker®, Rhodamine 123)[70], la membrane cellulaire (FM®, Celllight, DiI_{C18}, DiOC₁₈)[69], l'appareil de Golgi (ER-Tracker™, DiOC₅)[69], ou encore le lysosome (LysoTracker®, LysoSensor™)[69],... Pour

réaliser des images de microscopie contrastées, il n'est pas suffisant de disposer de sondes allant marquer spécifiquement ces différents compartiments : il est également nécessaire que ces sondes possèdent des propriétés d'absorption et/ou d'émission suffisamment différentes pour pouvoir les distinguer lors de l'acquisition de l'image.

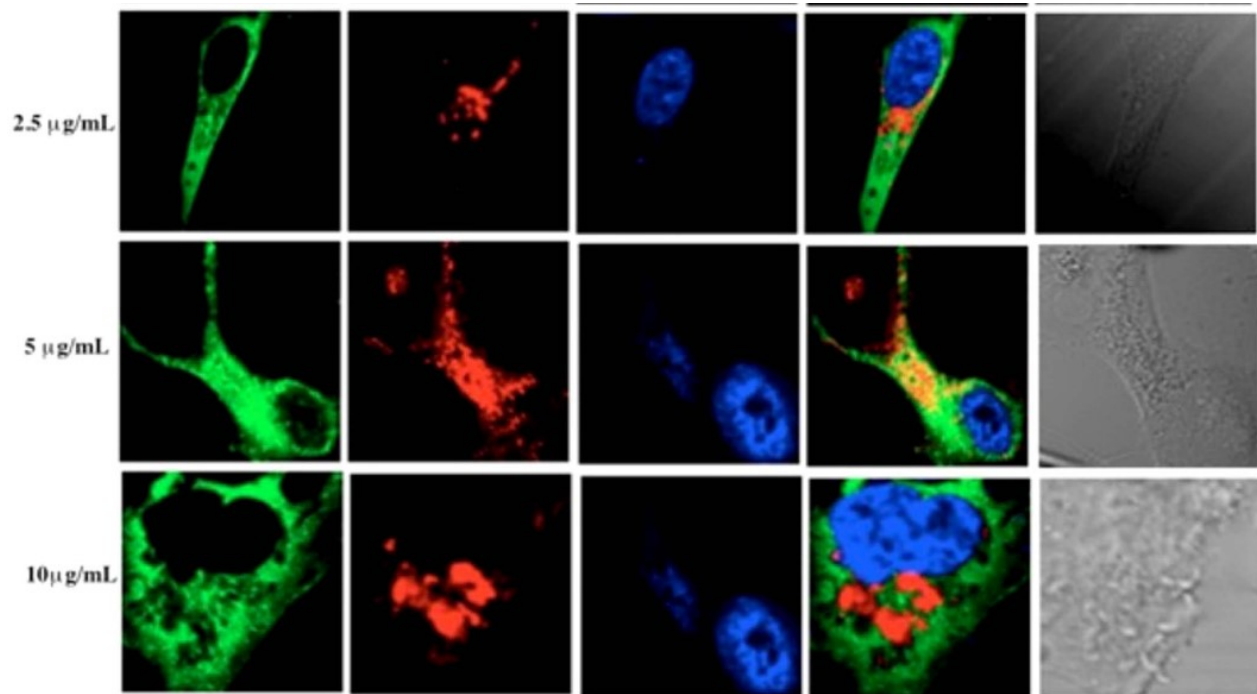


Figure B- 10 : Exemple de marquage cellulaire : Cellule RBE dont la tubuline est marqué par la tubuline-GFP (fluorescence verte), les lysosomes sont marqué par Superior Lyso Probe (fluorescence rouge), Hoechst 33342 marque le noyau (fluorescence bleu), image superposer et image microscopie optique à transmission.[71]

Les fluorophores ont d'autres applications que le strict marquage cellulaire. Ils peuvent servir à détecter des analytes ou des processus physiologiques via l'utilisation de sondes fluorogènes : on parle alors d'imagerie fonctionnelle[72]. Le principe des sondes fluorogènes repose sur le fait que leurs propriétés de longueur d'onde et/ou d'intensité de fluorescence vont être modifiées sous l'effet d'un stimulus. Ces molécules permettent de détecter la présence de différents composés d'intérêt biologique : cations (dont les ions H^+ , pour les sondes de pH) et anions, petites molécules réactives (métabolites, nutriments). Elles permettent aussi de suivre des processus biologiques comme les activités enzymatiques[73]. Ces dernières sont basées soit sur une réponse de type on-off ou on-on. Cette réponse est initiée via un processus chimique (complexation, rupture de liaison via un bras effondrable, création de liaison via une nouvelle réactivité accessible...) induisant une modification de la charge électronique de la molécule modifiant ses propriétés spectroscopiques.

Les sondes on-off sont réparties en deux catégories :

- le stimulus inhibe ou exacerbe la fluorescence,
- Le stimulus change les propriétés d'émission.

Les systèmes on-on sont généralement basés sur le principe de fluorescence par transfert d'énergie : FRET (fluorescence-resonance energy transfer en anglais)[74].

III Le défi des milieux biologiques complexes

Outre des propriétés spectroscopiques générales à tous les fluorophores utilisés dans le cadre de la microscopie de fluorescence pour l'imagerie biologique, une sonde devant être utilisée en milieu biologique *in-vivo* doit répondre à des critères spécifiques[75-77] :

- elle doit être biocompatible. Ce terme englobe à la fois la nécessité d'être hydrosoluble mais aussi d'être non toxique pour les organismes vivants. Les notions d'internalisation cellulaire et de ciblage sont aussi primordiales dans l'utilisation des chromophores *in vivo*. Ces problématiques seront discutées dans le chapitre 4.

- elle doit posséder à la fois une absorption et une émission dans le proche infrarouge tout en conservant un déplacement de Stokes important.

Ainsi, les chromophores présentés précédemment, bien qu'adaptés pour des études *in cellulo*, ne permettent pas d'imager efficacement le petit animal à cause d'une solubilité physiologique limitée et d'une faible profondeur de pénétration. Pour permettre ce type d'imagerie, il a donc été nécessaire de développer des sondes possédant une absorption et une émission intenses dans une zone particulière appelée fenêtre de transparence biologique.

III.1) Pourquoi travailler dans la fenêtre de transparence biologique ?

Le milieu biologique est constitué de différents tissus, fluides biologiques, macromolécules et organelles, pouvant absorber la lumière dans de larges gammes spectrales, souvent avec de grands coefficients d'absorption molaire. L'eau, la mélanine, l'hémoglobine sont ainsi autant d'espèces très absorbantes, parmi les plus constitutives des milieux biologiques. La Figure B- 11 récapitule les principaux domaines d'absorption de la peau humaine[78] et de divers constituants biologiques[79]. Il apparaît clairement une zone où l'absorbance du milieu biologique est moindre,

entre 650 et 1400 nm. C'est dans cette zone, qui est nommée « fenêtre de transparence biologique » (FTB), que la circulation des photons sera la moins perturbée.

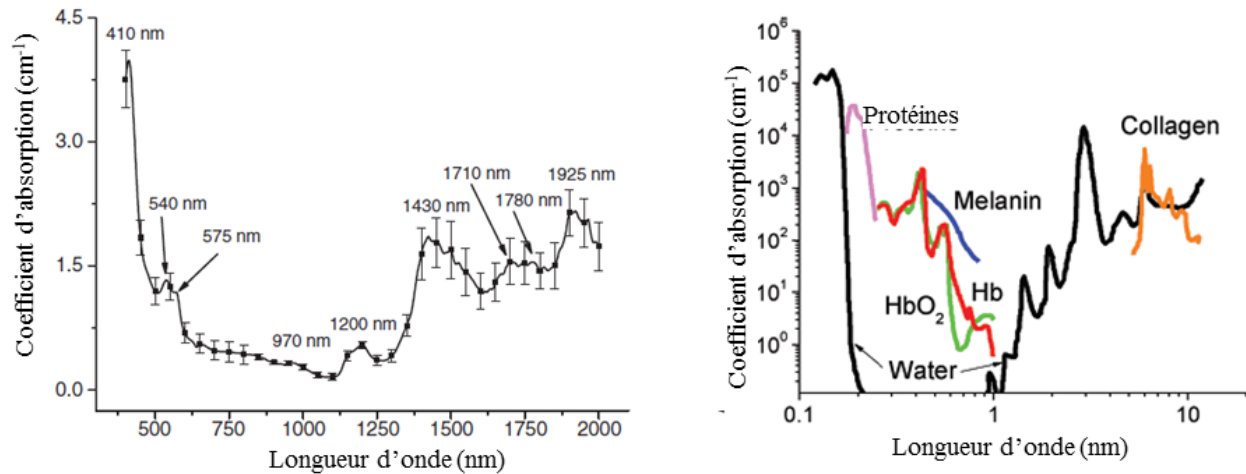


Figure B- 11 : gauche) coefficient d'absorption de la peau humaine droite) exemple du coefficient d'absorption de différents composants biologiques.

L'absorbance des tissus biologiques n'est pas le seul paramètre qui limite la qualité de l'imagerie de fluorescence. La pollution par la fluorescence de molécules biologiques (auto-fluorescence) est une autre source d'erreur (Figure B- 12). La majeure partie de ces molécules biologiques présentant des fluorescences à des longueurs d'ondes inférieures à 550 nm, cette auto-fluorescence peut être grandement réduite en travaillant avec des sondes possédant des longueurs d'onde d'émission supérieures à cette valeur.

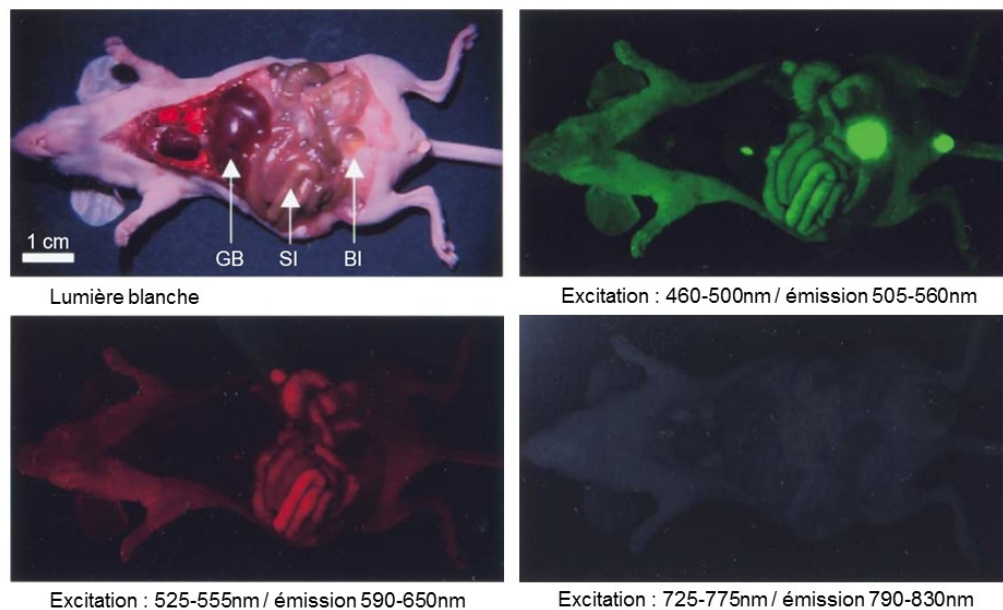


Figure B- 12 : Visualisation post mortem d'une souris de l'auto fluorescence en fonction de la longueur d'onde d'excitation et d'émission [80].

Le dernier point à prendre en compte concerne les limitations liées à la linéarité de propagation de la lumière. On peut citer quelques-uns des phénomènes physiques impliqués dans ces perturbations de la propagation linéaire des photons au sein des tissus : la réflexion, la réfraction, la diffusion. Dans le cas de la diffusion, la quantité de photons émis parvenant au détecteur du microscope diminue de façon exponentielle en fonction de la distance parcourue dans le tissu (z) et de la distance moyenne entre les événements de diffusion dans le tissu (l_z), selon la formule :

$$F = \alpha \exp(-2z/l_z)$$

Équation B- 1

Or cette distance moyenne de diffusion est inversement proportionnelle à la longueur d'onde de la source utilisée (à la puissance 4). Ainsi les photons bleus sont plus diffusés que les photons rouges eux-mêmes plus diffusés que les photons infrarouges[81]. La Figure B- 13.b montre l'impact de la diffusion Mie et Rayleigh en fonction de la longueur d'onde.

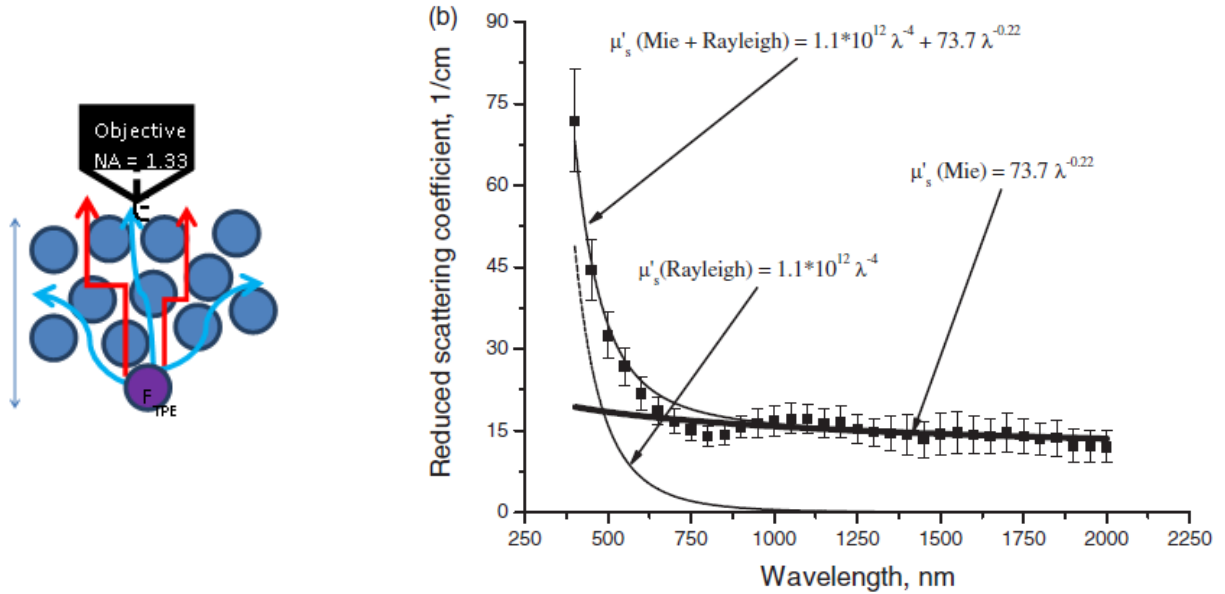


Figure B- 13 : a) Evolution du phénomène de diffusion en fonction de λ b) coefficient de diffusion réduit en fonction de λ contribution des diffusions de Rayleigh et Mie[78].

Le phénomène de diffusion influe sur la profondeur de pénétration (maximum de profondeur d'absorption) et de collecte de la fluorescence (émission).

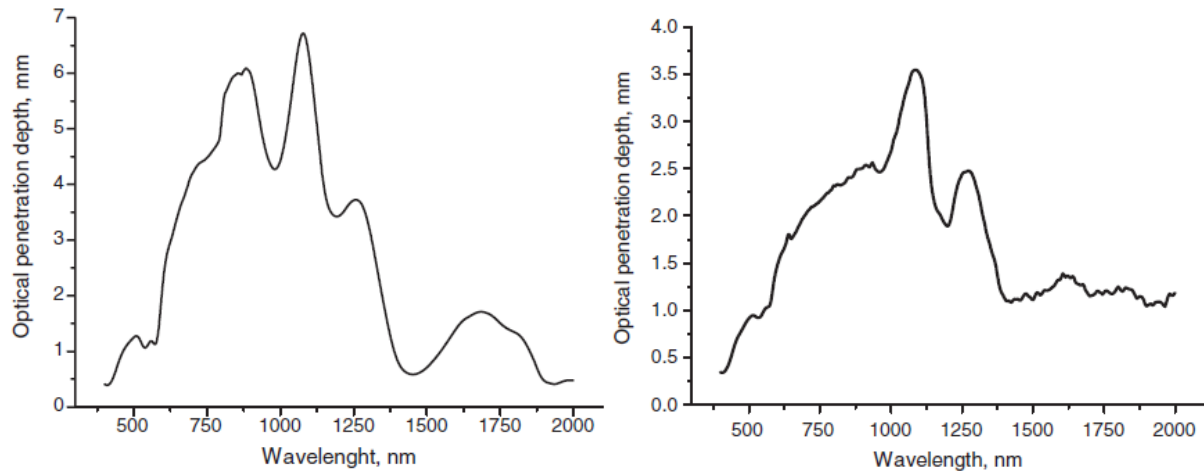


Figure B- 14 : Estimation de la longueur de pénétration à partir des coefficients de diffusion a) dans les muqueuses b) dans la peau humaine[78].

A ces phénomènes physiques s'ajoutent les limitations propres au système de mesure comme les longueurs d'ondes d'efficacité de la source lumineuse utilisée. Généralement un laser Ti-Sapphire présente une large bande dans la gamme 700-1000 nm, avec un maximum autour de 800-850 nm. La gamme de sensibilité optimale du détecteur, elle aussi variable, est à prendre en compte. En utilisant des chromophores possédant des propriétés d'absorption/ émission optimisées dans cette fenêtre spectrale, il est envisageable de réaliser des images à haute résolution et en temps réel sur un petit animal vivant, grâce à une profondeur de pénétration optimum.

III.2) Les chromophores émettant dans la fenêtre de transparence biologique pour l'imagerie biologique

III.2.a) Principes d'ingénierie

Pour décaler la longueur d'onde d'absorption et d'émission dans la zone de transparence biologique, différents paramètres peuvent être ajustés[67, 79, 82]. Ces derniers ont pour but de réduire l'écart énergétique entre l'état fondamental et l'état excité du fluorophore (soit, en première approximation, entre sa HO et sa BV), tout en limitant autant que possible les processus non-radiatifs (vibrations)[83, 84]. On peut citer, comme variable d'ajustement (Figure B- 15) :

- la longueur et surtout la nature de la conjugaison,
- la force des groupements donneurs et accepteurs,
- la rigidité du système,
- la planéité du système.

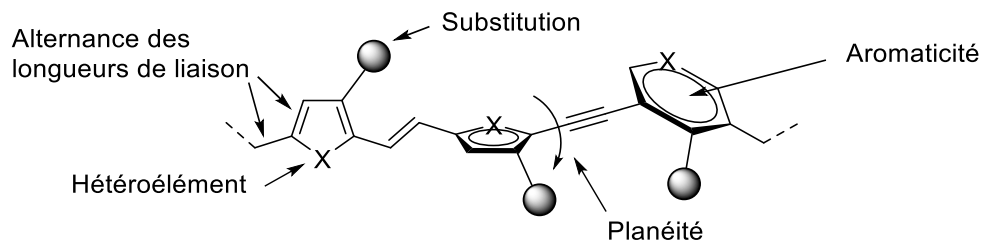


Figure B- 15 ; paramètres clés pour décaler absorption et émission dans la FBTB[84].

III.2.b) Les xanthènes

Ces molécules appartiennent à la famille des polyméthines rigidifiées par une succession de cycles aromatiques[1, 85, 86]. Les chaînes polyméthines sont des chaînes carbonées conjuguées reliées possédant un nombre impair de carbone CH et dont les extrémités sont reliées à des atomes électro-négatifs, conférant un caractère ionique à la structure. La plupart des molécules de cette famille très utilisée en imagerie, qui inclue les dérivés de la fluorescéine, des rhodamines mais aussi l'éosine, l'érythrosine et le rose Bengale, absorbe et émet en dehors de la FBTB. De subtiles modifications chimiques de leur structure, selon les paramètres évoqués plus haut, ont permis de décaler leurs propriétés spectrales afin de répondre à ces critères. A titre d'exemple, on peut citer le TexasRed sulphonyl chloride et la Rhodamine 800 (Figure B- 16). Une limitation de ces molécules reste leur faible déplacement de Stokes.

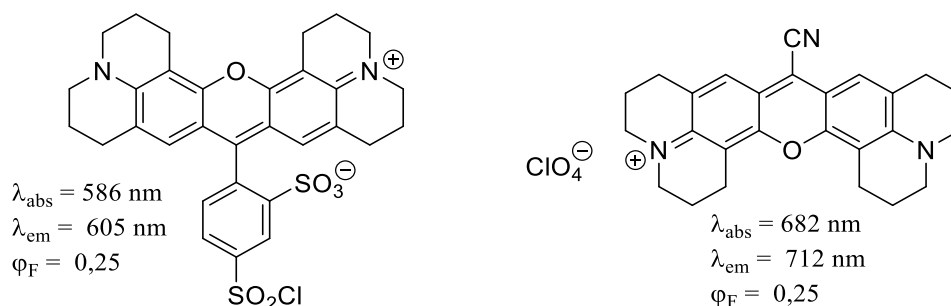


Figure B- 16 : Structure et propriétés spectroscopiques de Texa red (gauche) et Rhodamine 800 (droite).

III.2.c) Les cyanines

Les cyanines sont également des molécules de la famille des polyméthines, fonctionnalisées par deux groupements indole (ou dérivés d'indole) terminaux. Le travail sur la longueur et la substitution du pont polyméthine a permis d'obtenir des cyanines possédant des caractéristiques optimisées pour l'imagerie, présentant à la fois de forts coefficients d'absorption molaire ($\epsilon > 100000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}$), des absorptions et des émissions dans la FBTB ($\lambda_{abs} > 700 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} > 800 \text{ nm}$) et des rendements de fluorescence élevés. L'indocyanine green est approuvée par la FDA

pour la mesure de débit et de la clairance sanguine[87, 88]. Des exemples de cyanines sont présentés Figure B- 17 et leurs propriétés spectroscopiques regroupées dans le Tableau B-1.

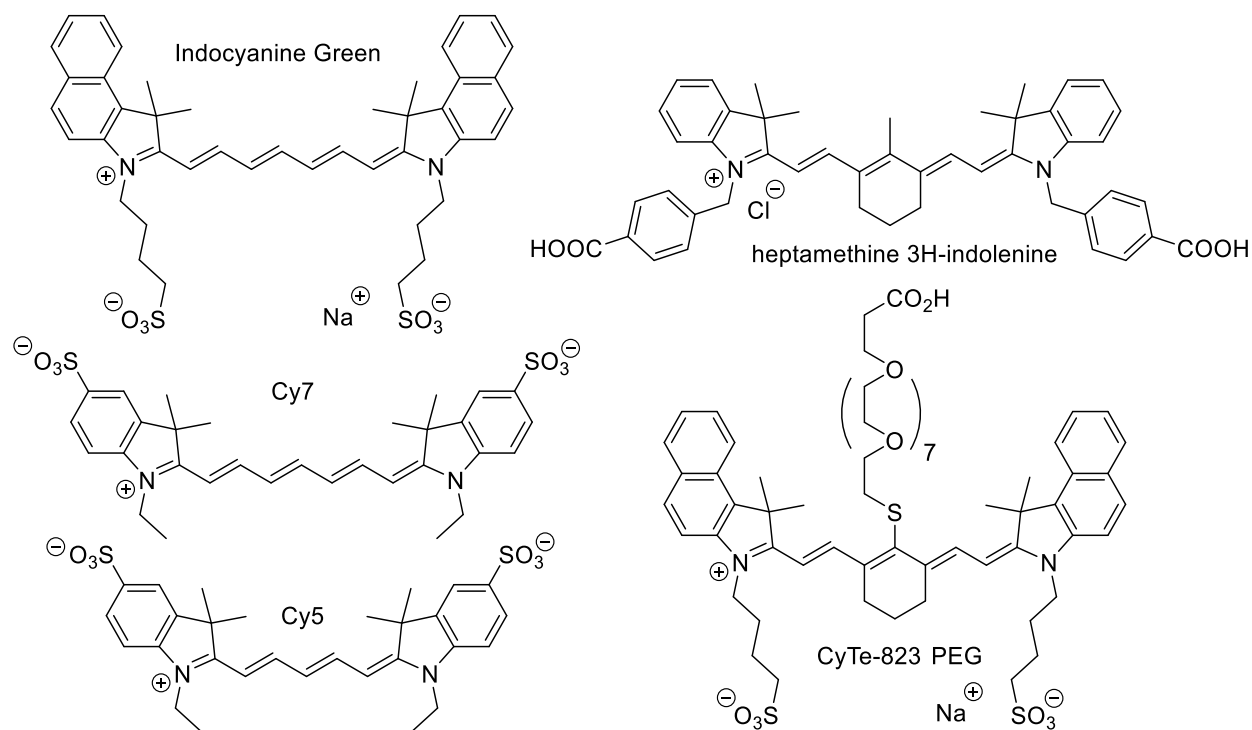


Figure B- 17 : exemples de cyanines émettant dans l'infrarouge.

Cyanine	λ_{abs}	λ_{em}	ϵ ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}$)	ϕ_F
Cy5	648	666	250000	18% (eau)
Cy7	745	775	250000	28% (eau)
Indocyaninegreen	775	813	113000	1,3% (eau)
heptamethine 3H-indolenine	786	814	250000	15% (éthanol)
alkyl-thioether	823	847	174000	2% (eau)

Tableau B-1 : données spectroscopiques associées aux cyanines de la Figure B- 17.

Les cyanines, qui font l'objet de nombreux travaux au laboratoire, sont étudiées pour la limitation optique, la microscopie et la rationalisation de l'effet polyméthine[89], l'électrooptique[90], senseurs[91] pour l'imagerie[92, 93]. La principale limitation des cyanines dans le contexte de l'imagerie biologique est le faible déplacement de Stokes et la faible photostabilité de ces molécules.

III.2.d) Les squaraines

Les squaraines sont des molécules constituées d'un cœur oxocyclobutenolate avec des extrémités conjuguées (cycle aromatique et/ou hétérocyclique). Elles font aussi partie de la famille des polyméthines. Ces molécules présentent une bonne photo-stabilité, de forts coefficients d'extinction molaire et de bons rendements quantiques de fluorescence. Elles présentent également des déplacements de Stokes plus importants que les cyanines, mais leur synthèse et leur hydrosolubilisation reste relativement complexe[94].

Squaraines	λ_{abs}	λ_{em}	ϵ (mol ⁻¹ .cm ⁻¹ .L)	ϕ_F
KSQ4	780	820	200000	40%
KSQ3		776	210000	44% toluène
waterdyes	653	677	141000	13% (eau)

Tableau B-2 : Données spectroscopiques associées aux squaraines de la Figure B- 18.

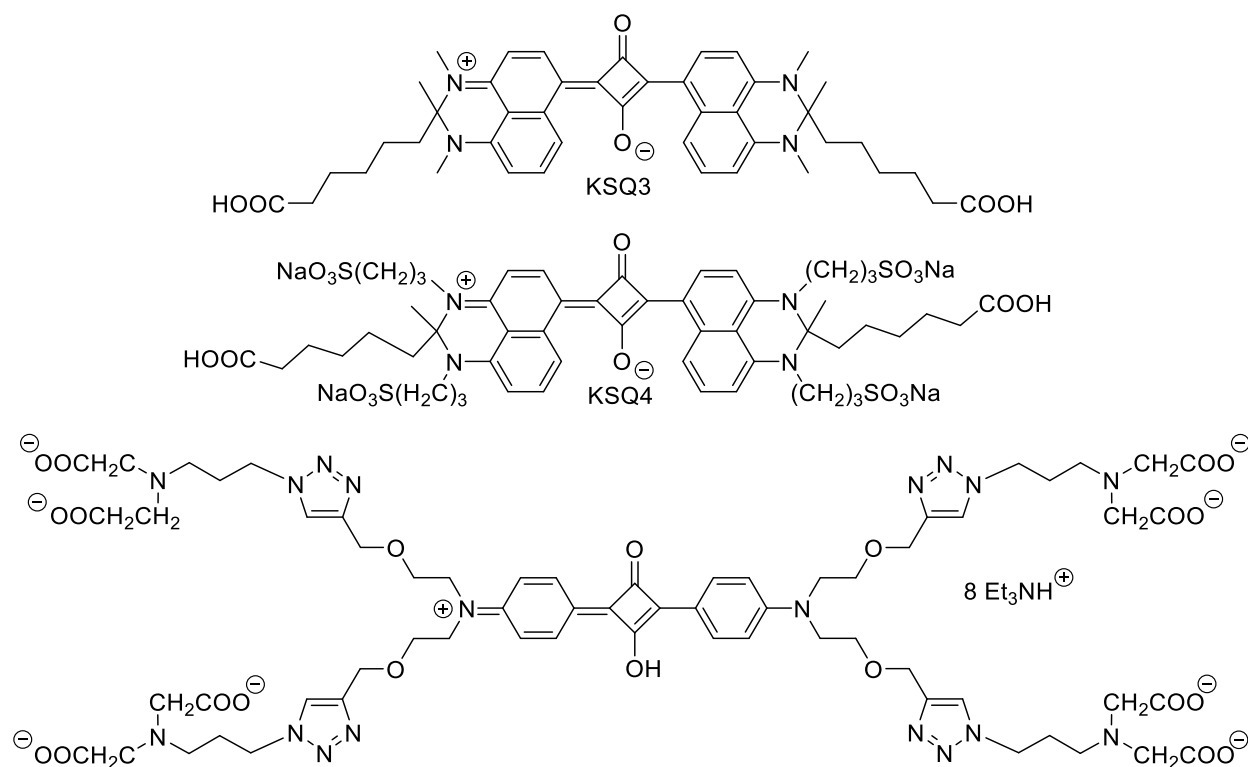


Figure B- 18 : Exemples de squaraines.

III.2.e) BODIPY

Les BODIPY sont également des dérivés de polyméthines, rigidifiés par un atome de bore[94-96]. La rigidité structurale leur confère une grande photo-stabilité et permet d'obtenir des dérivés possédant des rendements quantiques de fluorescence très élevés (rendement unitaire reporté dans

l'eau)[94-96]. Des exemples de BODIPY sont présentées Figure B- 19 et les données spectroscopiques Tableau B-3.

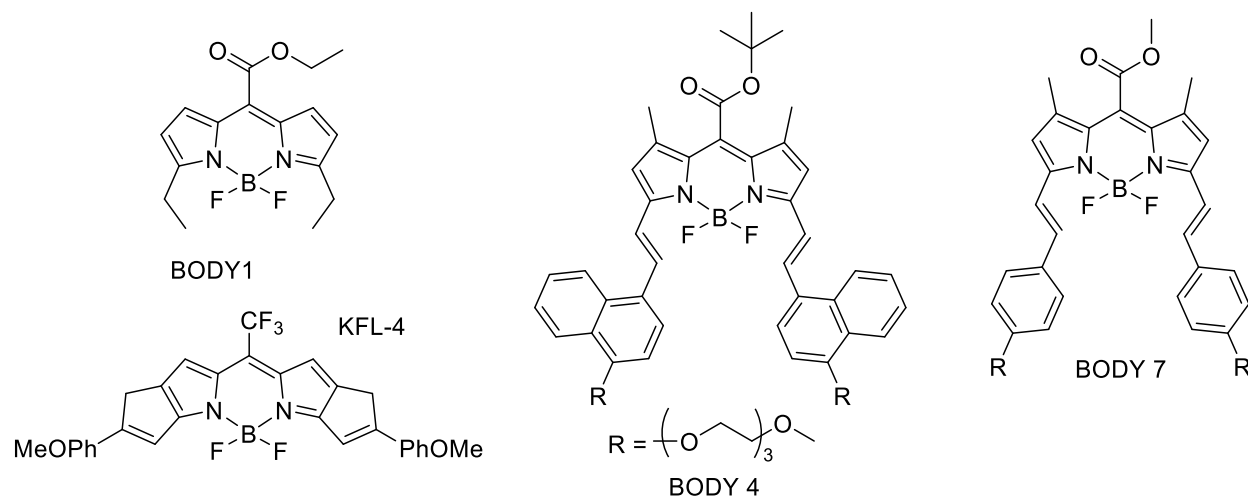


Figure B- 19 : Exemples de BODIPY.

BODIPY	λ_{abs}	λ_{em}	ϵ (mol ⁻¹ .cm ⁻¹ .L)	ϕ_F
KFL-4	723	738	253000	56% (CHCl ₃)
BODY 1	536	592	50000	78% (CH ₂ Cl ₂)
BODY 4	680	729	78000	11% (MeOH)
BODY 7	628	646	23000	15%

Tableau B-3 : données spectroscopiques associées aux BODIPY de la Figure B- 17.

Du fait de ces caractéristiques avantageuses, et de leur synthèse relativement aisée, les BODIPY sont abondamment utilisés en imagerie [97-101]. Les curcuminoïdes borylés sont une alternative aux BODIPY et leurs faibles déplacement de Stokes[102].

III.2.f) Protéine fluorescente mutante

La GFP (green fluorescent proteins) a été dans un premier temps observée dans des méduses bioluminescentes (*Aequorea victoria*). La fluorescence de cette protéine provient de la présence d'une molécule conjuguée, dont l'association avec certains acides-aminés dans la poche lipophile de la protéine forme un chromophore. Le développement de la GFP et de ses nombreux dérivés (protéines mutantes) ont permis de couvrir une large gamme de longueurs d'onde. Toutefois, ces protéines possèdent des caractéristiques spectroscopiques de rendement quantique et de coefficient d'absorption plutôt limitées par rapport aux molécules organiques référencées ci-dessus. L'intérêt de ces protéines dans le cadre de l'imagerie est que la séquence codante pour leur synthèse peut

être introduite au sein des séquences d'ADN génomique et plasmide, permettant le marquage pseudo « intrinsèque » d'organes, voire d'un organisme entier. Cette caractéristique a été utilisée dans l'étude permettant le suivi du développement d'animaux mais aussi de divers processus du métabolisme cellulaire[103, 104].

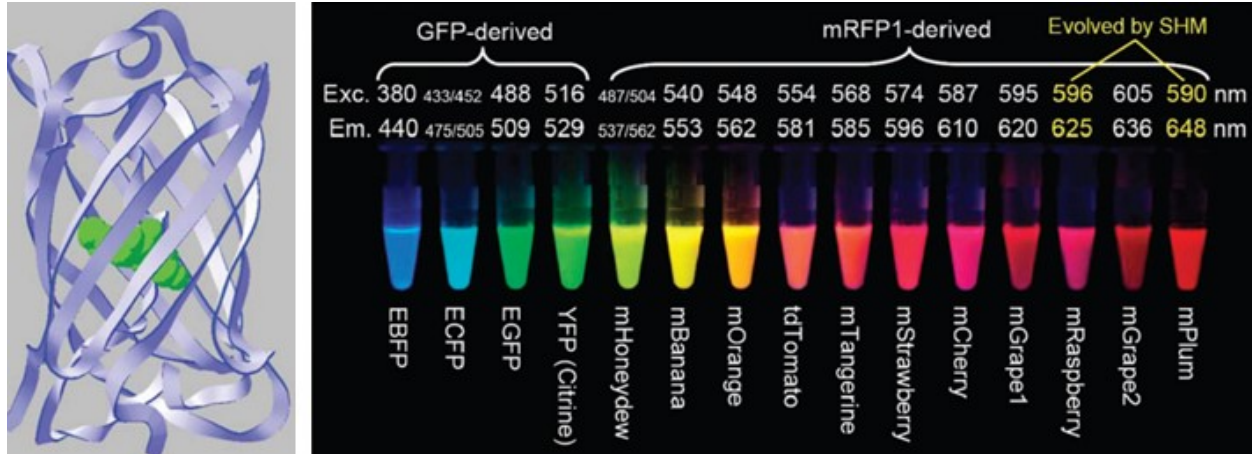


Figure B- 20 : Structure de la GFP et fluorescence de certaines protéines mutantes[1, 105].

III.2.g) Nanoparticules

Les nanoparticules fluorescentes de semiconducteur (quantum dots) sont composées de métaux du groupe II et du groupe IV (CdSe, CdTe) ou du groupe III et du groupe V (InP, InAs), généralement toxiques[106]. Le contrôle du diamètre (du cœur) de la nanoparticule permet d'influer sur la longueur d'onde d'émission, par des effets de confinement quantique (Figure B- 22). Elles présentent des coefficients d'extinction molaire des plus importants et d'excellentes photostabilités. Leur biocompatibilité est assurée par une fonctionnalisation de la surface de ces nanoparticules, généralement par stabilisation colloïdale à l'aide de tensioactifs hydrosolubilisants, ou des polymères[107]. Ces particules, qui donnent accès à des profondeurs de pénétration sans égal du fait de leur brillance exceptionnelle, permettent de réaliser des études d'imagerie impressionnantes chez le petit animal (Figure B- 21)[108]. Des exemples de propriétés spectroscopiques sont reportés dans le Tableau B-4[109-111]. Autre exemple de NP utilisées dans le cadre de l'imagerie, les UCPs, pour « upconverting phosphors », sont des composés dopés par des terres rares (lanthanides). Le phénomène de réabsorption à l'état excité (ESA) et de transfert d'énergie (ETU : energy transfer upconversion) permettent de réaliser des excitations dans l'infrarouge et de récolter des émissions à des longueurs inférieures, par un phénomène dit d'« upconversion »[112]. Des cristaux de NaYF₄ excités à 980 nm émettent par exemple à 660nm[113].

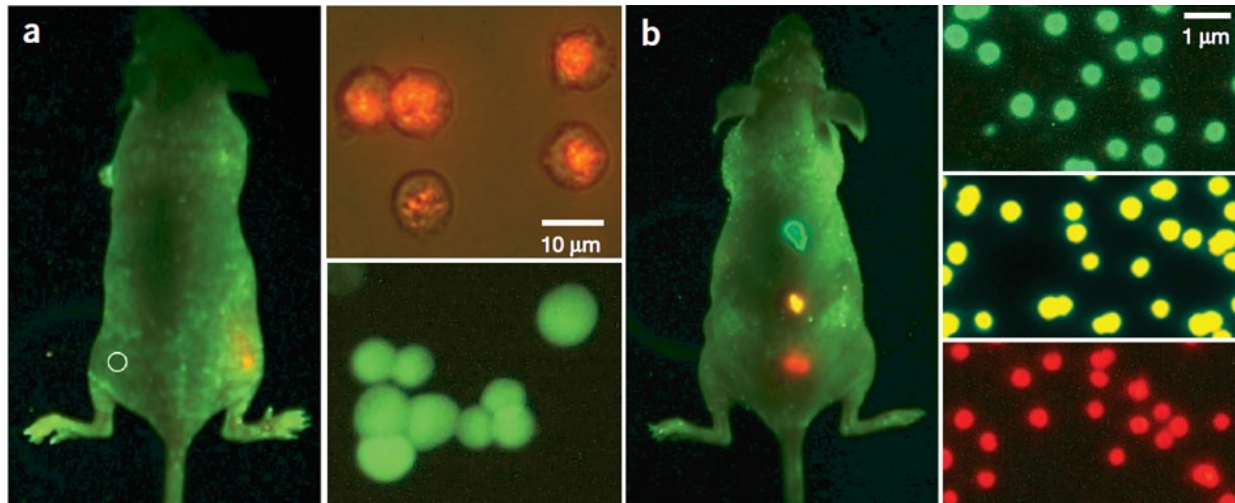


Figure B- 21 : souris fluorescente (GFP) : a) accumulation dans des cellules cancéreuses b) trois couleurs[108].

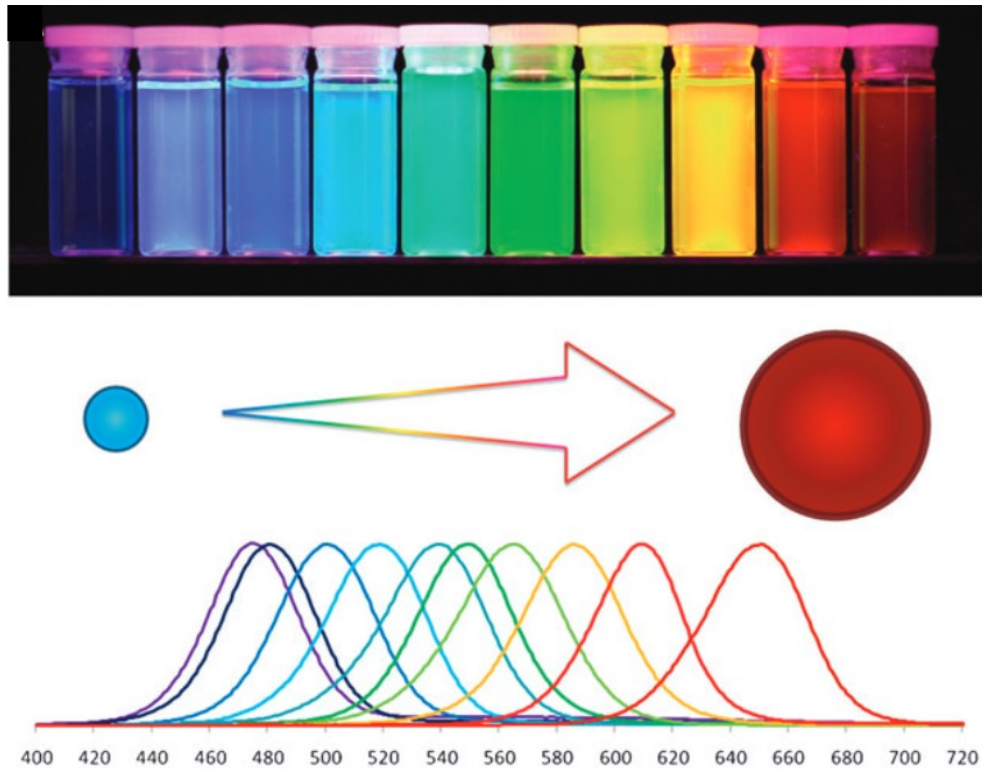


Figure B- 22 : Evolution de la longueur d'onde d'émission en fonction de la taille de la nanoparticule.

Nanoparticule	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	ϵ (mol ⁻¹ .cm ⁻¹ .L)	φ_F (solvant)	Diamètre cœur (nm)
Cœur (coquille)					
CdTe (CdSe)	775	850	580000	13% (PBS)	10
InAs(ZnSe)	-	820	-	9% (eau)	2
CuInSe (ZnS)	-	741	-	50 %	4

Tableau B-4 : Propriétés spectroscopiques de quelques nanoparticules.

IV Conclusion

La microscopie confocale permet d'imager de nombreux compartiments cellulaires. Les études d'ingénierie, notamment pour décaler les longueurs d'onde d'absorption et d'émission dans la fenêtre de transparence biologique et d'hydrosolubilisation ont permis d'utiliser cette imagerie *in vivo*. Cependant, la microscopie confocale reste limitée en résolution et ne permet pas d'imager à de fortes profondeurs. Bien que des optimisations de chromophores soient encore réalisables, ces limites sont inhérentes au dispositif de microscopie utilisé, en particulier à cause de la présence du « pinhole ». La résolution a été fortement améliorée grâce à de nouvelles techniques de microscopie de fluorescence dites de super-résolution (PALM, STORM,...). Des résolutions jusqu'à deux nanomètres sont reportées (Figure B- 23)[114-117].

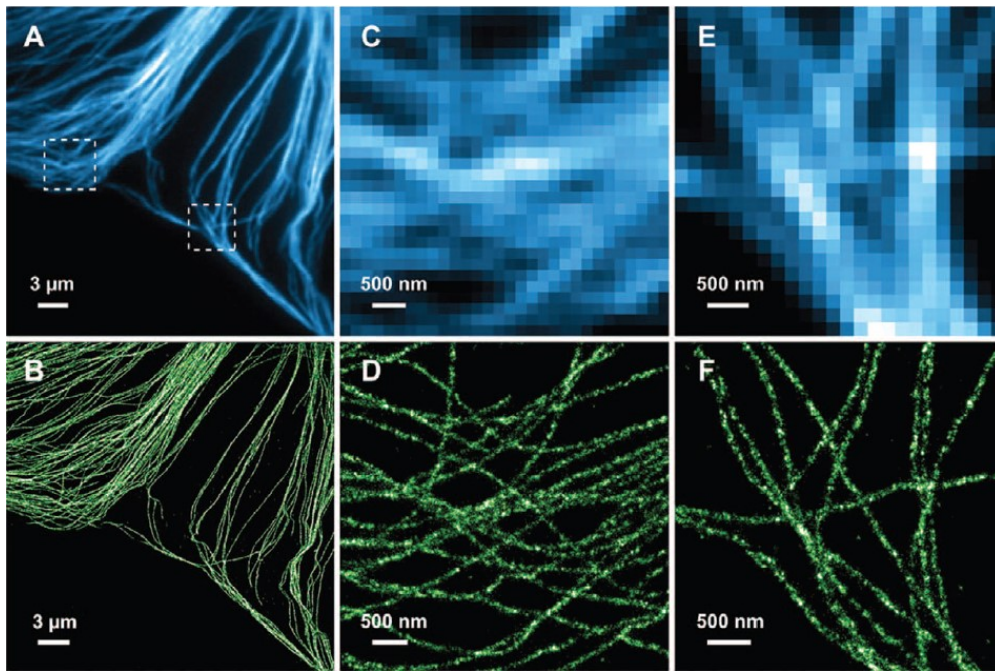


Figure B- 23 : Comparaison imagerie de fluorescence et STORM[118].

Toutefois, dans la cadre d'applications biophotoniques intravitales telles que celles développées dans le cadre de cette thèse, la microscopie de fluorescence induite à deux photons apparait comme l'alternative la plus prometteuse aux techniques confocales. Elle permet ainsi d'augmenter la longueur de pénétration dans les tissus grâce à l'utilisation de lasers de fortes puissances, le décalage de l'excitation dans le proche infra-rouge, et de ne pas utiliser le système de pinhole.

L'état de l'art des sondes spécifiques pour la microscopie de fluorescence à deux photons, et nos contributions à l'ingénierie de chromophores utilisables comme agents de contrastes pour cette microscopie, seront présentés en chapitres 3 et 4.

Chapitre n°1-section C - Photothérapie dynamique

La photothérapie dynamique (PTD) est une technique de traitement médical basée sur la photochimie [119]. L'utilisation d'un photosensibilisateur, molécule capable d'interagir avec la lumière en générant des espèces cytotoxiques, permet d'induire la mort cellulaire par simple irradiation. L'activation par la lumière a l'avantage de permettre un traitement localisé aux zones irradiées, et d'obtenir une sélectivité fortement améliorée par rapport aux autres formes de chimiothérapies. Aujourd'hui, pour des raisons liées à l'efficacité de pénétration limitée des ondes électromagnétiques UV-visible au sein des tissus biologiques (chapitre n°1-B), la PTD est généralement utilisée pour des traitements superficiels (peau). Des améliorations des protocoles thérapeutiques sont nécessaires pour généraliser l'utilisation *in vivo*. On peut citer par exemple le développement de lampes endoscopiques qui permettent d'acheminer par fibre optique l'énergie lumineuse au sein de l'organisme. Malgré tout, la pénétration de la lumière au sein des tissus est limitée, et l'intérêt principal des techniques PTD réside dans un couplage avec des techniques chirurgicales, afin d'éliminer des résidus tumoraux périphériques ou des petites métastases. Dans ce paragraphe, après un aperçu historique des développements de la PTD, un état de l'art des photosensibilisateurs utilisés dans le contexte clinique sera détaillé.

I La PTD : histoire d'une découverte

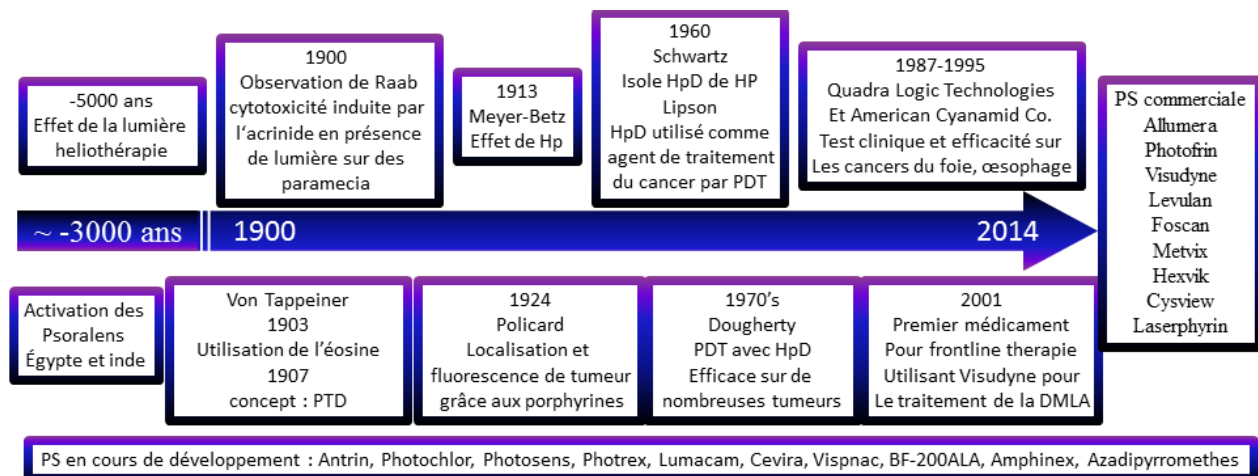


Figure C- 1 : Evolution de la PDT au cours des âges.

I.1) De l'antiquité...

Bien que le terme PTD ne soit apparu dans la littérature scientifique qu'en 1907, des pigments extraits de végétaux sont utilisés depuis l'antiquité pour le traitement des infections de la peau, comme l'attestent différents traités de médecine traditionnelle chinoise, indienne et égyptienne[120]. Dans la médecine traditionnelle indienne, l'Ayurveda, des extraits d'une plante, *la psoralea coryfolia* sont utilisés depuis près de 4000 ans pour divers traitements dermatologiques. Nous savons aujourd'hui que ces plantes contiennent des quantités importantes de psoralène, un photosensibilisateur absorbant dans l'UV (Figure C- 2) [121-123]. Ce photosensibilisateur, bien que relativement éloigné en terme d'efficacité des critères en vigueur aujourd'hui (sur lesquels nous reviendrons ultérieurement), est toutefois encore utilisé sous sa forme synthétique en dermatologie[124]. On peut citer le traitement d'affections bénignes du type psoriasis, eczéma, vitiligo[125] et même certains cas de lymphomes du derme, selon le protocole désigné sous le terme général de PUVA (pour Psoralène +UV-A)[126].

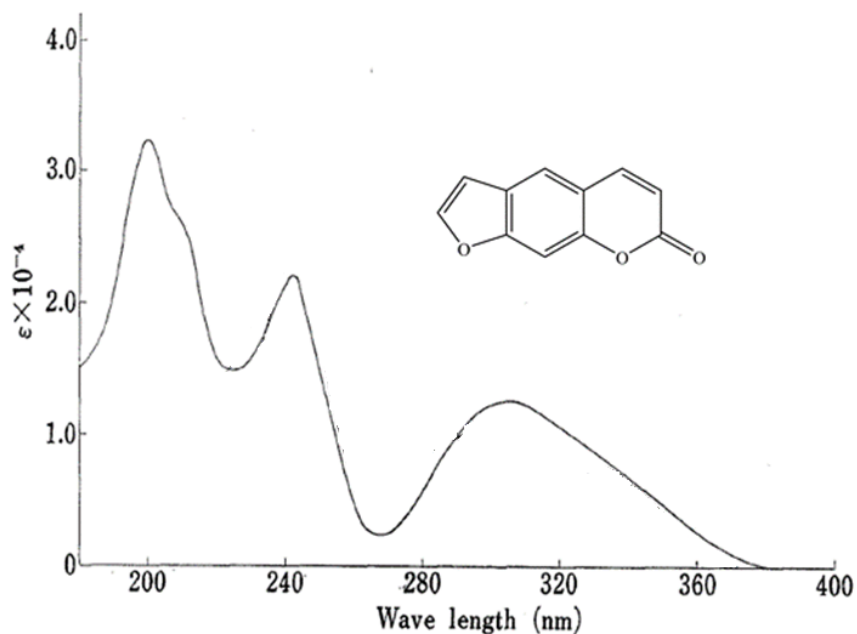


Figure C- 2: Absorption et structure chimique du psoralène.

I.2) ...aux recherches scientifiques modernes

A la fin du XIX^{ème} siècle, les travaux de Niels Finsen, prix Nobel danois de Médecine en 1903, montrent scientifiquement pour la première fois l'influence positive de la lumière sur les processus de cicatrisation [127]. La notion de photosensibilisateur exogène, c'est-à-dire de molécule thérapeutique introduite dans le but spécifique d'interagir avec la lumière pour générer l'effet thérapeutique désiré, ne fut introduite que quelques années plus tard.

En 1900, Oscar Raab, étudiant au département de pharmacologie de l'université de Munich dans le groupe d'Hermann Van Tappeiner, essaie de caractériser l'influence d'un composé chimique, l'acridine, sur le développement de *Plasmodium malariae*, une paramécie responsable de la Malaria. Très rapidement, Raab constate que, selon l'heure de la journée et les conditions atmosphériques, l'impact de l'acridine administrée sur la survie des micro-organismes semble considérablement varier. Il parvient rapidement à démontrer que le mécanisme de mort cellulaire induit par l'acridine nécessite l'activation par une irradiation lumineuse.

Dans la plupart des mécanismes d'induction de la mort cellulaire, en plus du photosensibilisateur et de l'activation lumineuse un troisième partenaire est nécessaire. Van Tappeiner identifie l'oxygène comme le troisième partenaire impliqué dans le mécanisme photo-induit. Il propose le terme de *photothérapie dynamique (PTD)* pour qualifier l'ensemble des protocoles thérapeutiques impliquant ces trois éléments (Figure C- 3). Ceci le conduit à établir dès 1903 le premier traitement de cancer de la peau basé sur l'irradiation d'un photosensibilisateur, l'éosine[128]. Une résorption totale de la tumeur est observée pour quatre des six patients, un succès très impressionnant, si l'on tient compte des connaissances en état sur les processus mis en jeu.

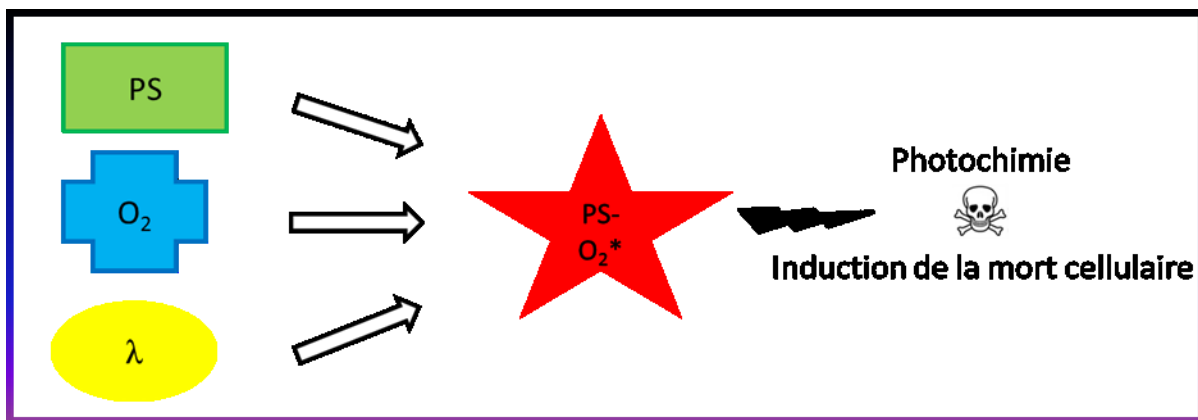


Figure C- 3: Principe de la photothérapie dynamique.

II Le processus photo-dynamique

II.1) Avant-propos

Deux types de mécanismes amenant à la PTD sont admis par la communauté scientifique : la photothérapie de type I et celle de type II.

II.1.a) La photothérapie dynamique de type I.

La photothérapie de type I est difficile à définir de manière systématique. Elle regroupe en effet des processus mettant en jeu un grand nombre de mécanismes photochimiques différents comme la formation de radicaux, des transferts électroniques, des cycloadditions,...

Il est donc difficile de trouver une réactivité commune autour de laquelle construire un travail d'ingénierie moléculaire. De manière générale les réactions peuvent être classées en deux catégories :

- les réactions basées sur des mécanismes d'oxydo-réduction, l'état triplet du photosensibilisateur pouvant alors directement réagir dans des réactions de transfert d'électrons ou de protons avec des substrats biologiques ou former des anions superoxyde. Ces intermédiaires évoluent ensuite vers des espèces oxydantes (ROS) comme le radical hydroxyle ou le peroxyde d'hydrogène (Figure C-4)[129, 130].
- les réactions intervenant directement entre le photosensibilisateur à son état excité (PS^*) et le substrat. Dans le cas du psoralène, il a ainsi été montré que le mécanisme à l'origine de la mort cellulaire implique une réaction de cycloaddition avec les bases thymine et adénine (Figure C-5)[131]. Le psoralène possédant deux sites susceptibles de faire des cycloadditions, il peut induire une réticulation de l'ADN, ce qui mène, via des processus biologiques à la mort cellulaire.

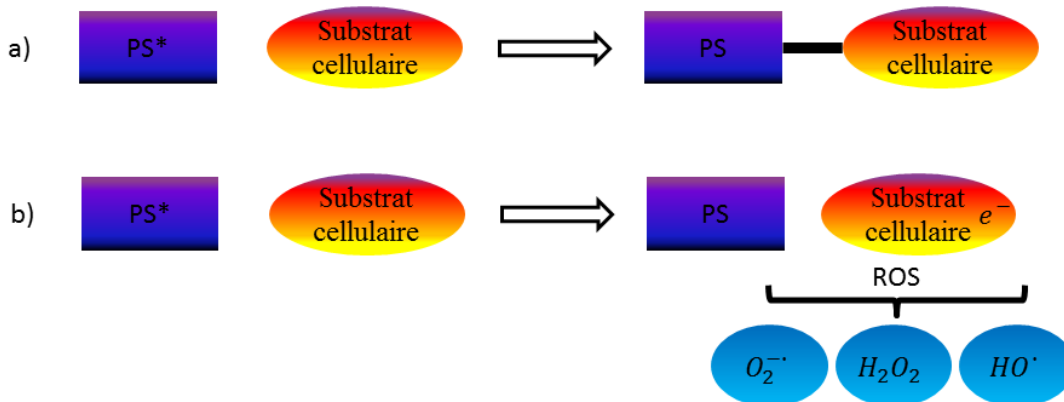


Figure C- 4 : Mécanisme de la PTD-type I. a) lien covalent cas du psoralène. b) génération de ROS (reactive oxygen species) pour espèces oxygénées réactives.

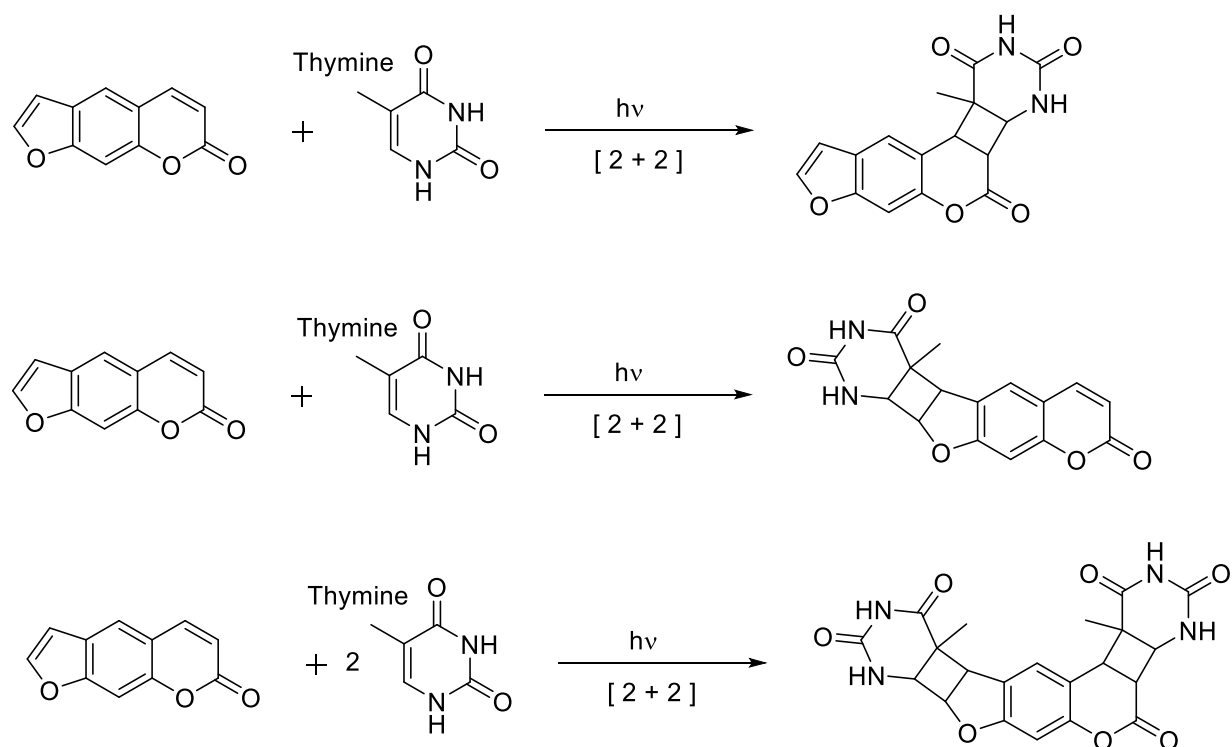


Figure C- 5 : Exemple de réticulation du psoralène avec la base thymine.

Des complexes de métaux de transition peuvent aussi provoquer des transferts électroniques photoinduits, conduisant à des réactions redox avec le substrat biologique (Figure C- 6). Des exemples de complexes de cobalt, de palladium de ruthénium, d'iridium, d'osmium et de nickel sont reportés dans la littérature[132-134]. Leurs associations avec des ligands pouvant s'intercaler dans l'ADN permettent de favoriser un transfert d'électron vers ce dernier, qui joue le rôle d'accepteur d'électrons et initie le clivage de l'ADN pouvant provoquer la mort cellulaire.

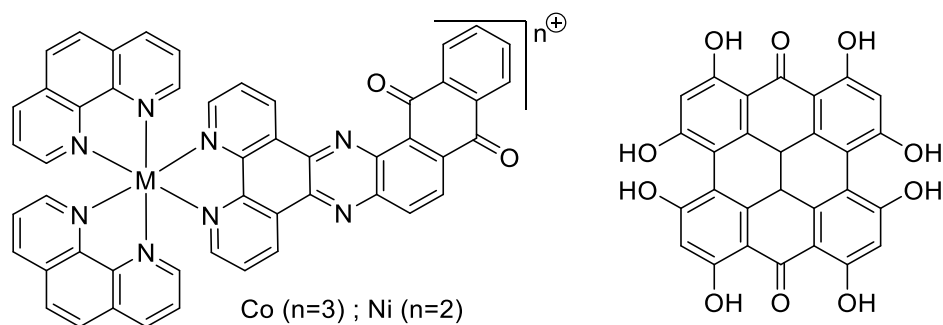


Figure C- 6 : Exemple de complexe de cobalt et de nickel permettant le photoclivage de l'ADN et structure de l'hypericine.

Les composés possédant un faible potentiel redox comme les alcools et les quinones induisent aussi des transferts de radicaux et de protons générant des ROS, l'hypericine en est exemple (Figure C- 6). Cependant le mécanisme complet fait intervenir la production d'oxygène singlet.

II.1.b) La photothérapie de type II

Cette dernière, de loin la plus couramment étudiée, est basée sur l'activation d'un composant cytotoxique unique, l'oxygène singulet. Le modèle mécanistique de la photosensibilisation de l'oxygène singulet a longtemps été l'objet de controverses. La compréhension de son mécanisme de formation et de son rôle dans le processus photodynamique a permis d'initier le travail de conception des premiers photosensibilisateurs, et d'entreprendre par la suite un travail systématique d'optimisation.

II.1.b.i) Histoire d'une controverse[135, 136]

Les premières hypothèses sur le rôle de l'oxygène ont été apportées au début du vingtième siècle par Van Tappeiner, mais les principes physico-chimiques mis en jeu restèrent longtemps sujets à caution.

Les travaux de Gilbert Newton Lewis (PN) en 1924, initiateur de la théorie de Lewis qui porte son nom, permirent d'attribuer une configuration électronique de type triplet pour l'état fondamental de l'oxygène, c'est-à-dire une structure présentant deux électrons des couches externes de la molécule non appariés et de même spin (molécule paramagnétique)[137]. Cinq ans après, Robert Mulliken, physico-chimiste américain, dont les travaux sur les orbitales électroniques moléculaires lui valurent le prix Nobel fut en mesure, grâce à l'approche théorique qu'il avait développée, de proposer une structure de l'oxygène permettant d'expliquer le spectre d'absorption électronique de l'oxygène atmosphérique[138]. Cette structure permet d'identifier en plus de l'état triplet fondamental, deux états de spin nul que sont les deux états excités singulets $^1\Delta_g$ et $^1\Sigma_g^+$ (Figure C- 7).

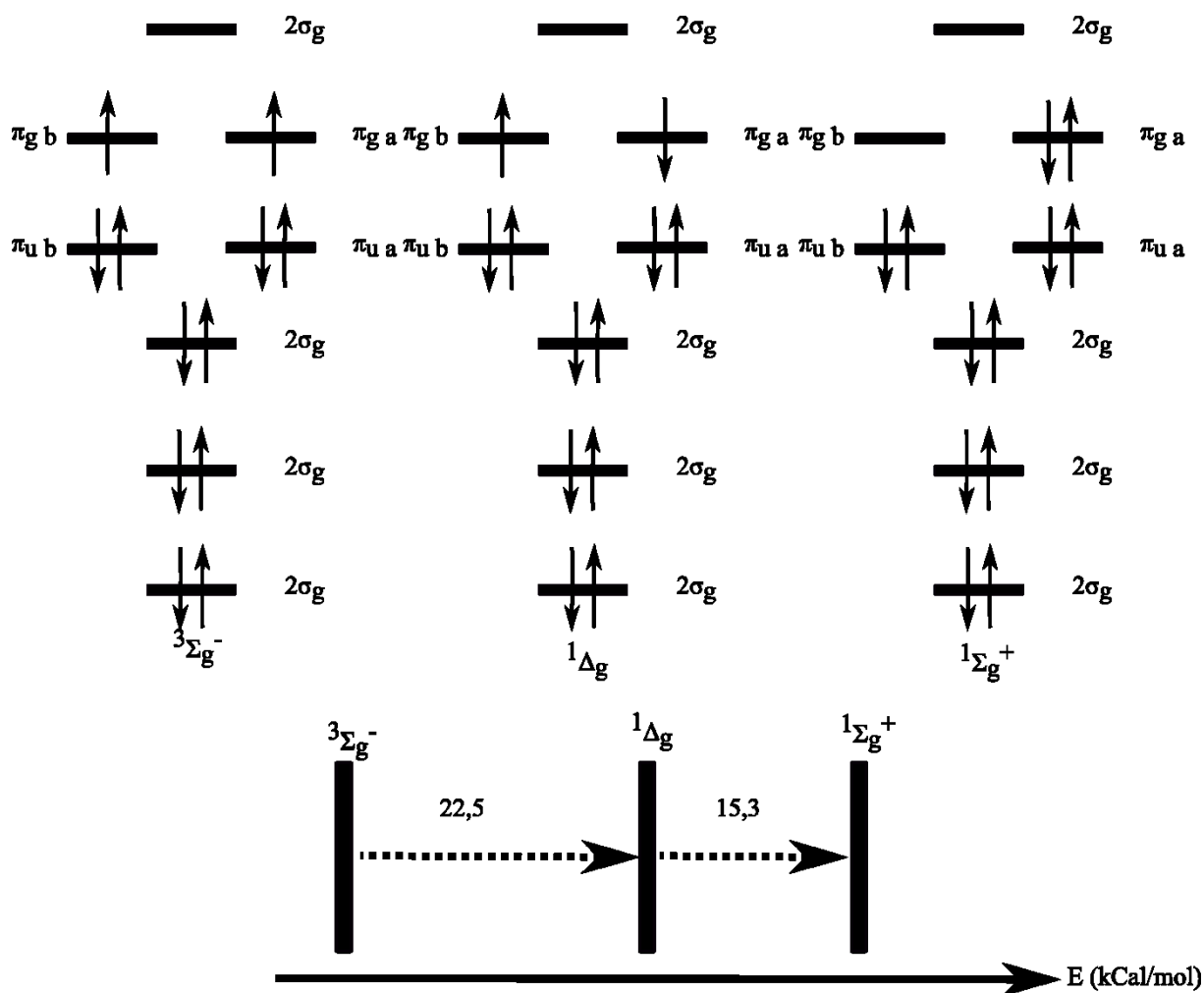


Figure C- 7: Etats spectroscopiques de l'oxygène prédits par Mulliken et les énergies associées.

En 1931, le groupe de Kautsky suggéra, après étude du mécanisme d'oxydation photo induite de la leucomalachite green, que la réactivité particulière observée ne pouvait s'expliquer que par la formation intermédiaire d'oxygène singulet[139]. Ils démontrèrent par ailleurs que cette espèce pouvait diffuser sur plusieurs nm au sein du milieu cellulaire, expliquant rétrospectivement l'efficacité remarquable du traitement. Les travaux de Gaffron montrèrent peu après que l'irradiation d'une hématorphyrine dans sa bande d'absorption infra-rouge située à 820 nm (équivalent à une énergie de 35kcal/mol) conduisait à la formation d'une espèce oxydante. L'énergie fournie au système étant inférieure à celle nécessaire à peupler l'état excité de haute énergie $1\Sigma_g^+$ de l'oxygène (37 kcal/mol), qu'on supposait alors être l'état réactif[140], ce résultat semblait définitivement écarter ce dernier comme intermédiaire réactif. De 1937 à 1964, un quasi-consensus tendit donc à s'établir sur un modèle alternatif mettant en jeu la formation d'un adduit

réactif entre le photosensibilisateur et l'oxygène, et le terme « oxygène singulet » disparut progressivement de la littérature scientifique.

II.1.b.ii) Confirmation du rôle de l'oxygène singulet[141]

En 1963, la caractérisation expérimentale de la formation d'oxygène singulet fut apportée par Michael Kasha, chimiste américain, qui détecta le phénomène de phosphorescence $^3\Sigma_g^- \leftarrow ^1\Delta_g$, à une longueur d'onde d'émission située à 1270 nm, soit une énergie de 22kcal/mol[142-144].

La preuve définitive de l'implication de l'oxygène singulet comme intermédiaire dominant de la photothérapie fut finalement établie par Christopher Foote en 1964[145-147]. Il faut donc avoir un chromophore possédant un état excité caractérisé par une durée de vie longue. Cette durée de vie rend possible un transfert d'énergie de l'oxygène triplet vers l'un de ces état singulet alors que le photosensibilisateur retrouve son état fondamental (Figure C- 8)[132].

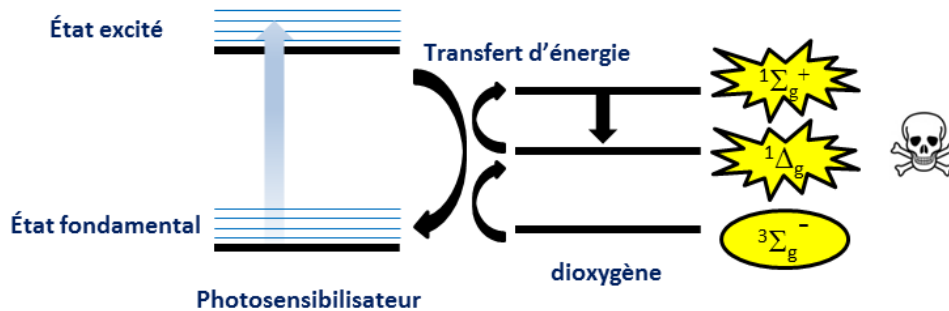


Figure C- 8 : Représentation simplifiée de la photothérapie selon le diagramme de Jablonski.

II.1.b.iii) Mode d'action du PS dans la destruction des cellules

L'oxygène singulet peut diffuser au sein des tissus cellulaires et conduire à la mort cellulaire par deux mécanismes principaux. Par le biais d'oxydation de différents acides aminés (tryptophane, tyrosine, histidine, méthionine et cystéine, principalement) ou acides nucléiques (Thymine, adénine) tout d'abord, provoquant ainsi la dénaturation des structures protéiques ou de l'ADN et l'ARN. Ce sont les deux causes principales permettant d'expliquer la mort cellulaire. C'est sur la base de ce mécanisme qu'a été développé l'ensemble des traitements PTD modernes.

Les nécroses et l'apoptose des cellules sont les mécanismes généralement responsables de la mort cellulaire[148]. Certains processus sont dits directs, car impliquant une internalisation du PS au sein de la cellule. Dans ce cadre, les mitochondries sont les organelles les plus ciblées : la perméabilisation de leurs membranes libère du cytochrome c qui induit l'hydrolyse de nombreuses

protéines conduisant à la mort cellulaire. L'ADN et l'ARN peuvent aussi être affectés par le PS comme nous l'avons illustré auparavant (Figure C- 5). Par ailleurs, en ciblant la membrane cellulaire, certains PS provoquent l'effondrement du cytosquelette, entraînant la formation de vésicules et finalement la mort cellulaire.

Certains processus sont dits indirects car ils ne demandent pas d'internalisation du PS au sein de la cellule. Le PS provoque une diminution de la concentration en oxygène, dans le cas de la génération d'oxygène singulet par exemple, au sein des tissus. Les cellules sont alors en hypoxie et se dégradent. Si la libération d'agent toxique est très forte on peut observer l'occlusion des vaisseaux sanguins[149]. En privant les cellules d'apport en oxygène et en nutriments, la mort cellulaire est déclenchée.

Un autre mécanisme résultant d'une réponse immunitaire est par ailleurs commun à ces deux modes d'action, direct et indirect. L'activité du PS provoque une inflammation aigüe au sein des tissus cancéreux. Cette inflammation permet une immunostimulation, se traduisant par l'afflux des lymphocytes T et B. Les anticorps spécifiques libérés par ces leucocytes induisent une réponse immunitaire[150].

L'efficacité de génération d'oxygène singulet peut être contrôlée par la structure du PS et l'optimisation de ce dernier passe par un travail d'ingénierie moléculaire important de la part des chimistes.

II.2) Photophysique de la génération d'oxygène singulet.

II.2.a) Générer de l'oxygène singulet

L'écriture de l'état fondamental et des deux premiers états excités de l'oxygène nous a permis d'identifier la formation d'oxygène singulet. Le passage d'un état triplet à un état singulet n'est pas permis par les règles de sélection d'absorption. De plus, le faible coefficient d'extinction de l'oxygène ne permet pas une excitation efficace par simple irradiation lumineuse. Le photosensibilisateur est donc un élément essentiel à sa génération.

Le mécanisme de génération de $O_2(^1\Delta_g)$ par un photosensibilisateur est présenté Figure C- 9. Afin de permettre un transfert d'énergie efficace à l'oxygène, le PS doit répondre à plusieurs critères. Seuls les critères énergétiques seront discutés ici. Le PS doit être capable :

- de capter de l'énergie issue d'une irradiation lumineuse. Un coefficient d'extinction molaire, ϵ , élevé est nécessaire.
- de transmettre ensuite cette énergie à l'oxygène. Le rendement quantique de génération d'oxygène singulet φ_{Δ} , permettant de quantifier ce phénomène doit être maximal.

La combinaison de ces deux facteurs appelés figures de Mérite, $\varphi_{\Delta} \cdot \epsilon$ rend compte de l'efficacité d'un PS à générer de l'oxygène singulet.

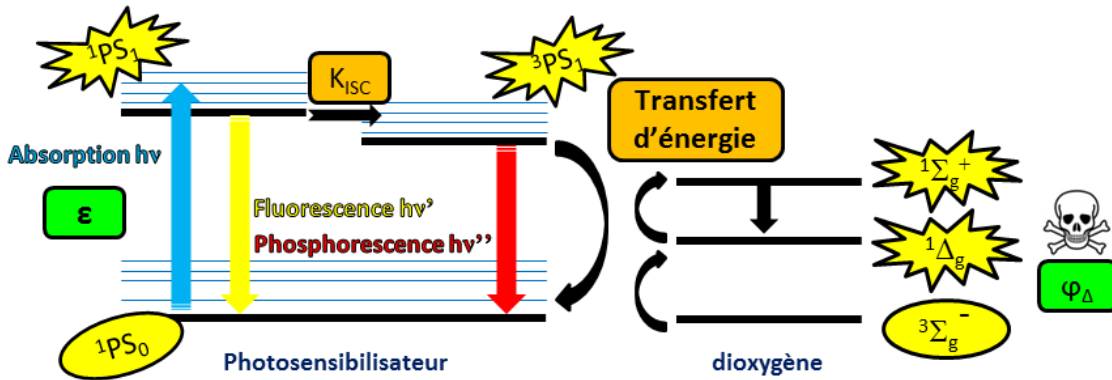


Figure C- 9 : Photophysique de génération d'oxygène singulet.

II.2.b) De l'absorption aux transferts énergétiques, ce qui se cache sous le rendement quantique de génération d'oxygène singulet

Pour observer un transfert d'énergie avec l'oxygène, le PS doit se trouver dans un état excité. Le paramètre physique décrivant cette étape est le rendement quantique de génération d'état excité noté φ^{ex} . Le PS doit donc avoir une grande valeur de ϵ . Une fois que le PS se trouve dans un état excité, il faut qu'il y ait une rencontre entre le PS* et une molécule d'oxygène, via la formation d'un complexe collisionnel (PS-O₂)*, dont la probabilité d'apparition est définie par la théorie des collisions : le temps de vie de l'état excité mis en jeu, la concentration du PS et la concentration de l'oxygène dans le milieu influent sur la vitesse de cette étape. Ces paramètres sont généralement regroupés sous le « terme efficacité d'inhibition de l'état excité du PS par l'oxygène », noté $f_{O_2}^{ex}$ [151]. La dernière étape cinétique est la désexcitation du complexe induisant la génération de l'oxygène singulet. Le pourcentage associé à cette désexcitation conduisant à O₂(¹Δ_g) est noté S_{Δ}^{ex} . Ces deux derniers termes correspondent au phénomène de transfert d'énergie de la Figure C- 9. Dans le cadre générale de la Figure C- 9, on peut écrire le rendement quantique comme :

$$\varphi_{\Delta} = \varphi^S f_{O_2}^S S_{\Delta}^S + \varphi^T f_{O_2}^T S_{\Delta}^T$$

Équation C- 1

II.2.c) Efficacité d'inhibition des états excités par l'oxygène

La formation du complexe collisionnel (PS-O₂)* est en concurrence avec de nombreux phénomènes classiques de luminescence et de désexcitation non radiative (Section A). Trois paramètres peuvent être avancés pour favoriser la formation du complexe collisionnel[152, 153] :

- le temps de vie des états excités. Plus il est long, plus la chance de former le complexe est grande.
- une condition énergétique. L'état excité du PS doit être positionné favorablement pour un transfert d'énergie. Une valeur légèrement supérieure à 94,1 kJ/mol pour un transfert avec l'état ¹Δ_g ou à 158,2 kJ/mol avec l'état ¹Σ_g est requise. Inversement, une position énergétique trop élevée de l'état excité peut aussi limiter le transfert d'énergie.
- la vitesse de diffusion et la concentration en oxygène. Plus la concentration en oxygène est grande, plus la probabilité de rencontre avec un PS* est importante. A l'inverse, si dans le milieu la diffusion de l'oxygène est faible, le nombre de chocs sera plus faible.

Après excitation, le PS se retrouve dans un état singulet (règle de Kasha). Ces états ont généralement des durées de vie courtes (10⁻⁹s). A faible concentration en dioxygène, la réaction est limitée par la diffusion du dioxygène. Dans les cellules où la pression partielle est de 25 à 40 Torr, la génération d'oxygène singulet n'est pas observée car sa durée de vie ne permet pas d'obtenir un complexe (PS-O₂)*[154]. Pour des concentrations d'oxygène inférieures ou égales à une concentration atmosphérique, l'état énergétique triplet possédant une durée de vie plus longue (10⁻⁶-10⁻⁴s) est généralement considéré comme seul responsable du transfert énergétique conduisant à la génération d'oxygène singulet. L'Équation C- 2 s'écrit alors :

$$\varphi_{\Delta} = \varphi^T f_{O_2}^T S_{\Delta}^T.$$

Équation C- 2

Sous des pressions élevées en oxygène, la réactivité de l'état singulet peut être observée[152]. Sous une pression de 2280 Torr, Wilkinson et col, ont démontré l'existence d'un transfert d'énergie à partir de l'état singulet sur des dérivés d'anthracène[155]. Le 9,10-dicyanoanthracène a par exemple un rendement quantique de génération d'oxygène singulet de deux dû à deux transferts d'énergie successifs de S₁ vers T₁ puis de T₁ vers S₀ générant deux molécules d'oxygène singulet (Figure C- 10).

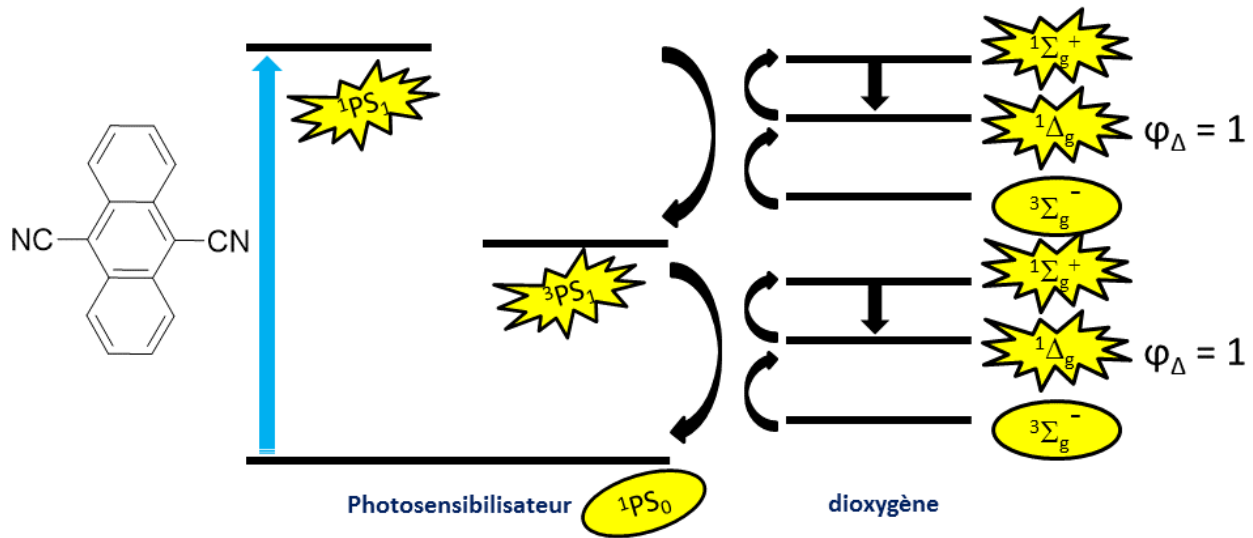


Figure C- 10 : Structure du dicyano-anthracène et production d'oxygène singulet.

II.2.d) Rendement quantique de génération de l'état triplet.

Pour pouvoir maximiser la génération d'état triplet à partir de l'état excité singulet correspondant, il est nécessaire que la constante cinétique de croisement inter-système k_{ISC} soit la plus élevée possible. Pour lever la règle d'interdiction de changement de multiplicité de spin, deux grandes stratégies sont utilisées. Elles reposent toutes deux sur l'augmentation du couplage spin-orbite qui permet de partiellement lever les règles de sélection.

II.2.d.i) L'effet d'atome lourd

Cet effet permet d'expliquer la levée de la règle de sélection de spin qui permet d'atteindre un état de spin triplet [156]. L'opérateur spin-orbite correspond à un couplage entre le moment magnétique orbitalaire et le moment magnétique de spin. La correction d'énergie due au couplage s'écrit pour un hydrogénoïde :

$$E_{n,l,s} = E_n - \mu_s \cdot B_l = E_n - \frac{Z e^2 \mu_0}{8\pi m_e^2 r^3} (s \cdot l)$$

Équation C- 3

avec :

- e la charge de l'électron,
- μ_0 la perméabilité magnétique dans le vide,
- Z le numéro atomique,
- m_e la masse électron,
- r distance électron – noyau.

La constante de couplage spin-orbite s'écrit :

$$a = \frac{Z e^2 \mu_0 \hbar^2}{8\pi m_e^2} \int \psi_{n,l,m}^* \frac{1}{r^3} \psi_{n,l,m} d\tau$$

Équation C- 4

Cette constante s'écrit dans le cas d'un champ coulombique :

$$a \propto \frac{Z^4}{n^3 l(l + \frac{1}{2})(l + 1)}$$

Équation C- 5

avec :

- n le nombre quantique principal,
- l le nombre quantique orbital.

Cette dernière écriture montre que le couplage spin-orbite est favorisé par la présence de noyaux lourds avec un nombre quantique principal petit. Les halogènes sont de ce fait particulièrement intéressants[157-159]. Des exemples incorporant du soufre, du sélénium ou des métaux de transition sont aussi rapportés[160]. Le milieu peut aussi induire un effet d'atome lourd on parle d'effet d'atome lourd externe[161].

II.2.d.ii) Effets de doublets non liants

La présence de doublets non-liants favorise aussi le croisement inter-système. En effet, la présence de doublets non-liants au sein de structures aromatiques permet l'observation de nouvelles transitions électroniques (n/π^*) notamment dans les composés N-hétérocycliques[156, 162, 163]. El Sayed a montré que le couplage spin-orbite entre des états de symétries différents $S(n/\pi^*)/T(\pi/\pi^*)$ ou $S(\pi/\pi^*)/T(n/\pi^*)$ est permis. A l'inverse, les couplages entre états de même symétrie $S(\pi/\pi^*)/T(\pi/\pi^*)$ sont interdits. On peut donc écrire des nouvelles règles de sélection pour le couplage spin-orbite :

$$\begin{aligned} \langle S_{n,\pi^*} | K | T_{n,\pi^*} \rangle &\approx \langle S_{\pi,\pi^*} | K | T_{\pi,\pi^*} \rangle \approx 0 \\ \langle S_{n,\pi^*} | K | T_{n,\pi^*} \rangle &\neq 0 \end{aligned}$$

Équation C- 6

Ces phénomènes permettent d'expliquer la forte génération d'oxygène singulet observée avec les porphyrines.

II.2.d.iii) Méthode de détermination du rendement de génération de l'état triplet[164].

Il existe de nombreuses méthodes permettant d'estimer l'ordre de grandeur du rendement quantique de génération de l'état triplet (ϕ^T) : annihilation triplet-triplet[165], étude cinétique de retour à l'état fondamental par absorption transitoire [166], mesure de phosphorescence[165]. Ces méthodes donnent accès à la photophysique des états excités triplets des composés étudiés, mais ne permettent pas une mesure précise de ce paramètre.

II.2.e) Efficacité de génération d'oxygène singulet

Une fois que le PS est dans un état triplet (ϕ^T) et que le complexe collisionnel ($f_{O_2}^T$) est formé, la désexcitation de ce complexe peut mener à la génération oxygène singulet S_{Δ}^T (Figure C- 11)[152, 167]. Les états excités du complexe PS-O₂ sont en équilibre et les constantes de croisement inter-système k_{ISC} sont telles que $k_{ISC} \gg k_T^{O_2}$. La génération relative des espèces $^3\Sigma_g^-$, $^1\Delta_g$ et $^1\Sigma_g^+$ dépend de la compétition entre les différentes vitesses de conversion interne $k_T^{^3\Sigma_g^-}$, $k_T^{^1\Delta_g}$ et $k_T^{^1\Sigma_g^+}$. Ces constantes de vitesse sont liées aux différences d'énergie entre l'état triplet du PS et les différents états de l'oxygène $\Delta E_p^{O_2}$.

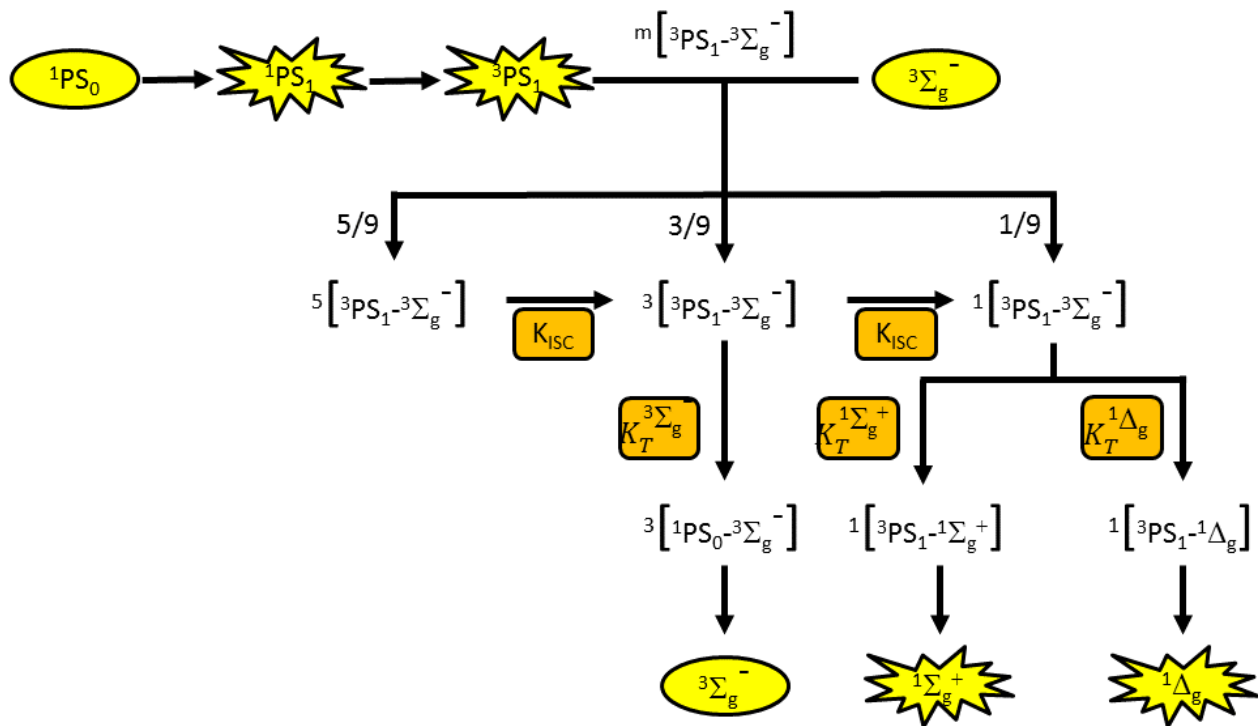


Figure C- 11 : Mécanisme de désexcitation du complexe (PS-O₂)*.

Schmidt a démontré sur une série de chromophores que le tracé de $k_T^{O_2} = f(\Delta E_p^{O_2})$ donne une courbe décroissante. Comme $\Delta E_p^{^1\Sigma_g^+} < \Delta E_p^{^1\Delta_g} < \Delta E_p^{^3\Sigma_g^-}$ on peut écrire la relation suivante entre les constantes cinétiques $k_T^{^1\Sigma_g^+} < k_T^{^1\Delta_g} < k_T^{^3\Sigma_g^-}$. Cette relation est importante car elle signifie que S_Δ et ϕ_Δ peuvent tendre vers 1 [168]. Expérimentalement, on détermine le rendement de génération d'oxygène singulet ϕ_Δ suivant les méthodes de détermination décrites en annexe n°2.

II.2.f) Durée de vie de l'oxygène singulet

Les rendements quantiques de phosphorescence de l'oxygène singulet sont directement liés à la durée de vie de ce dernier, qui va très fortement dépendre de son environnement, en particulier du solvant dans lequel est effectuée la mesure. Cette dépendance est mise en évidence dans le Tableau C- 1.

Solvant	$\tau_{1\Delta}$	Solvant	$\tau_{1\Delta}$	Solvant	$\tau_{1\Delta}$
H ₂ O	3,1	CH ₃ CN	77,1	C ₆ F ₆	21000
CH ₃ OH	9,5	CH ₂ Cl ₂	99	C ₆ F ₁₃ I	25000
C ₆ H ₁₄	23,4	CHCl ₃	229	C ₂ Br ₂ F ₄	31000
C ₆ H ₆	30	C ₂ HCl ₃	247	CS ₂	45000
C ₅ H ₁₂	34,7	C ₆ D ₆	681	CCl ₄	59000
(CH ₃) ₂ CO	51,2	(CD ₃) ₂ CO	992	C ₆ F ₁₄	68000
D ₂ O	68	CDCl ₃	7000	C ₂ Cl ₃ F ₃	72000

Tableau C- 1: Evolution de la durée de vie (ns) de l'oxygène singulet en fonction du solvant d'étude [152, 169].

Dans les solvants protiques, $^1\Delta_g$ a ainsi une durée de vie très faible à cause de sa désexcitation vibrationnelle provoquée par les liaisons O-H. De manière analogue, mais dans une moindre mesure, la présence de liaisons C-H tend aussi à raccourcir cette durée de vie. Cette tendance peut être inversée en substituant le proton par des éléments plus lourds. Une substitution au deutérium des liaisons C-H se traduit par une amplification de $\tau_{1\Delta}$, d'un facteur entre vingt et trente. On retrouve le même ordre de grandeur si on remplace les atomes de deutérium par des atomes d'halogène encore plus lourds.

Au-delà de son implication pratique pour la quantification du processus de génération d'oxygène singulet, la durée de vie de cette espèce est un paramètre très important pour l'application cible : elle influe en effet directement sur la distance de diffusion de l'espèce réactive au sein d'un milieu (équation C-2). Paradoxalement, ce qui pourrait apparaître comme une limitation explique en grande partie la très grande sélectivité des traitements par PTD : l'oxygène restant à proximité immédiate de la zone d'irradiation. Dans un milieu hydrophobe, le champ d'action y est plus grand

car il y a moins de vibreurs OH. Une relation simple permet de relier la distance d'action et $\tau_{1\Delta}$. [170]

$$d = \sqrt{6\tau_{1\Delta}D}$$

Équation C- 7

Avec : - D le coefficient de diffusion de l'oxygène,
 - d : le rayon d'action de l'oxygène.

III Critères cliniques du photosensibilisateur idéal

La PTD est aujourd'hui utilisée dans le traitement d'une grande variété d'affections et de dégénérescences des tissus superficiels de l'organisme. Une dizaine de formulations de photosensibilisateurs sont disponibles sur le marché des médicaments, principalement pour des applications en dermatologie et ophtalmologie. En dermatologie, pour le traitement de lésions cutanées (Lupus vulgaris, acné), cancéreuses ou précancéreuses (kératose actinique, maladie de Bowen, carcinomes). En ophtalmologie, l'un des principaux traitements de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) implique un mécanisme de PTD. Ces traitements, par le biais de méthodes fibroscopiques, s'étendent aussi désormais aux tissus superficiels de la bouche, de la langue, du tube digestif (maladie de Barrett), de la vessie. Des médicaments sont en phase d'étude clinique ou pré-clinique pour le cancer du poumon, de la prostate et (au prix de techniques naturellement plus invasives) de certaines tumeurs cérébrales [171, 172]. Il faut noter que les PS trouvent aussi des applications en dehors des traitements ophtalmiques ou oncologiques comme leurs utilisations pour l'élimination d'agent pathogène ou en tant qu'antifongique [173].

III.1) Déroulement classique d'un traitement

Le déroulement général d'un traitement PTD est présenté Figure C- 12 [119]. Il est constitué de quatre phases.

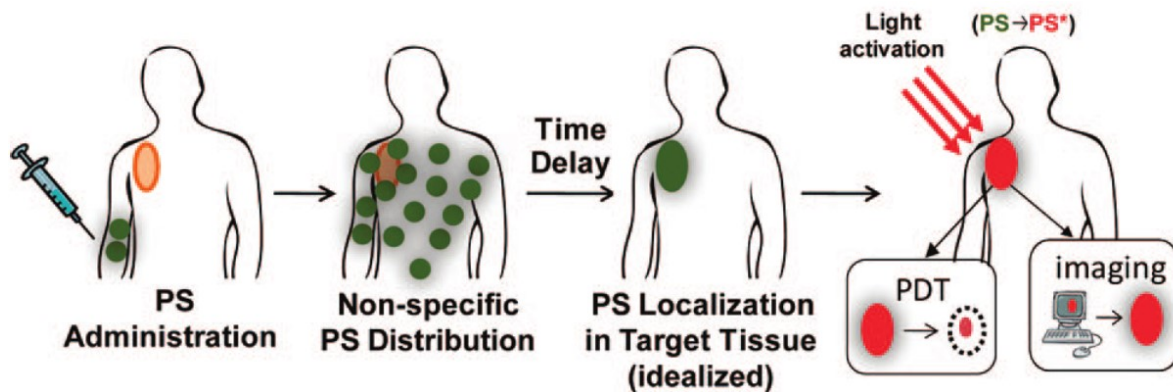


Figure C- 12 : Les quatre phases du traitement PTD : administration, distribution non spécifique du PS, localisation du PS au sein de la tumeur, localisation de la tumeur par imagerie et traitement PTD suite à une activation par la lumière.

Phase d'administration

L'administration d'un traitement par PTD peut, selon la zone à traiter, être réalisée par voie orale, cutanée ou par injection intraveineuse du photosensibilisateur.

Phase d'accumulation

Après un délai d'attente, l'accumulation du PS dans les zones ciblées (typiquement tumeurs) permet de commencer le traitement. Le délai d'incubation pour les composés commerciaux est généralement de deux à six heures.

Phase de détection

La présence du photosensibilisateur dans la zone à traiter doit être confirmée avant d'engager son activation. Cette confirmation se fait généralement par détection du signal résiduel de fluorescence du photosensibilisateur.

Phase d'activation du traitement

L'irradiation de la zone à traiter, via des sources lumineuses de forte puissance (50 à 200 mW/cm²), déclenche la cascade de processus évoquée précédemment aboutissant à la mort cellulaire. Les sources utilisées aujourd'hui sont de type LASER, LED LASER, ou plus rarement LED classiques (nécessitant des durées d'irradiation plus importantes)[174].

III.2) Intérêt du traitement du cancer par la photothérapie dynamique

La PTD présente de nombreux avantages thérapeutiques par rapport aux méthodes « classiques » de traitement des cancers[175-177] :

- Il s'agit d'un mode d'action plus doux. Comparée à l'ablation chirurgicale des tumeurs, elle est faiblement invasive. Comparée à l'utilisation des rayons X ou aux chimiothérapies « classiques » elle occasionne des effets secondaires moins sévères. La nécessité de la présence concomitante du PS et de l'irradiation lumineuse en fait un traitement très sélectif, cantonné à quelques mm³.
- La PTD est généralement qualifiée d'indolore. Certains traitements provoquent cependant des œdèmes au niveau des zones traitées. L'irradiation lumineuse peut occasionner sur la zone photosensibilisée une sensation de démangeaison, de picotement, voire des réactions d'inflammations.
- Le temps d'hospitalisation est fortement réduit avec ce type de traitement. C'est un atout majeur en terme financier pour les centres médicaux mais aussi un bénéfice évident pour le patient. L'apparence du tissu cicatriciel est très nettement améliorée par rapport aux autres traitements (cancers de la peau et du visage).

III.3) Limites d'utilisation actuelle

Pour des arguments similaires à ceux déjà évoqués dans le cadre de la microscopie, l'acheminement de la lumière jusqu'à la zone à traiter est une limitation majeure au développement de la PTD. La diffusion et l'absorption de celle-là par les tissus biologiques restreint l'utilisation de la PTD aux traitements de lésions superficielles. Cela explique la limitation de son utilisation à des traitements de surface (dermatologie) où des lampes peuvent être utilisées. Il existe deux grands axes pour développer son utilisation pour des traitements internes. Soit l'utilisation de fibre optique via la voie endoscopique qui achemine la lumière directement au niveau des cellules cancéreuses, méthode déjà utilisée en imagerie[178]. Soit en jouant le rôle de complément à des techniques chirurgicales en éliminant les cellules cancéreuses résiduelles par irradiation après ablation de la zone cancéreuse.

Le fait que la période de photosensibilisation induite par le traitement perdure généralement bien au-delà de la durée de celui-ci contraint à limiter l'exposition du patient à la lumière naturelle pendant des temps pouvant atteindre plusieurs semaines ce qui nécessite une protection (habillage total et port de lunettes noires)[179].

Les patients souffrant de porphyrie, maladie génétique les rendant incapables de métaboliser les dérivés de porphyrine, ne peuvent pas être traités par ce type de molécules qui

constituent l'immense majorité sinon la totalité des photosensibilisateurs disponibles sur le marché. Si les lésions tumorales affectent des vaisseaux sanguins d'importance, le recours à la PTD est impossible à cause de l'occlusion possible de ces vaisseaux. Chez les patients, l'observation du fond de l'œil pendant le temps de photosensibilisation suivant le traitement est aussi impossible, ce qui complique le suivi post-opératoire dans le cas de la DMLA[179].

En plus de ces contraintes générales, chaque photosensibilisateur possède des contre-indications qui lui sont propres, liées en majorité à des phénomènes d'accumulation souvent insuffisamment contrôlés et à des voies métaboliques d'élimination variables.

III.4) Le photosensibilisateur idéal : cahier des charges

Nous avons vu dans les paragraphes précédents les avantages que les traitements PTD pouvaient présenter par rapport à des thérapies classiques, notamment dans le cadre du traitement du cancer. Le photosensibilisateur est un élément crucial de ce dispositif : pour que l'efficacité du traitement soit maximisée en générant un minimum d'effets indésirables, il est nécessaire qu'il possède un certain nombre de propriétés. Les stratégies mises en place pour le développement de nouveaux photosensibilisateurs ont donc été dictées par la nécessité pour ces derniers de répondre à ce cahier des charges[136, 180]. On peut résumer ainsi les caractéristiques d'un photosensibilisateur idéal pour des applications biomédicales :

- La molécule doit être pure, hydrosoluble et biocompatible.
- En absence d'irradiation, elle ne doit ni posséder de toxicité (aigüe ou à long terme), ni générer de réaction immunitaire.
- Le chromophore doit être sélectif des zones à traiter (cellules cancéreuses).
- La durée de circulation dans l'organisme doit être courte, permettant une accumulation rapide et une élimination efficace par les voies naturelles. Il ne doit pas y avoir d'accumulation dans les organes, notamment ceux responsables de son élimination (rein, foie, rate).
- Il faut que l'imagerie de la zone à traiter soit réalisable pour commencer le traitement : de fait, soit le photosensibilisateur possède une luminescence résiduelle permettant sa détection (au détriment d'un meilleur rendement de génération d'oxygène singulet et avec une localisation qui amorce le processus de thérapie), soit on associe le PS à des matériaux

hydrides possédant une sonde luminescente (par exemple une sonde fluorescente qui peut être activée en utilisant une autre longueur d'onde).

- Le chromophore doit être inerte chimiquement face aux enzymes et autres macrophages.

Il est difficile de répondre efficacement à toutes ces contraintes. Les paragraphes suivants traitent des exemples de photosensibilisateurs cliniques et de l'évolution de leur formulation afin de répondre au mieux à ce cahier des charges.

III.5) Photosensibilisateur : propriétés spectroscopiques

L'optimisation des propriétés d'un photosensibilisateur idéal pour la PTD de type II requiert la prise en compte des paramètres spectroscopiques suivants[136, 180] :

- maximisation du coefficient d'absorption molaire $\epsilon > 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$,
- maximisation du rendement quantique de génération d'oxygène singulet ϕ_{Δ} ,
- absorption dans la zone de transparence biologique [650-1200nm],
- photoblanchiment limité permettant de maintenir les propriétés spectroscopiques tout au long du traitement,
- fluorescence résiduelle notable et dans la zone de transparence biologique afin de pouvoir attester la présence du photosensibilisateur dans le tissu à traiter. Il s'agit d'un compromis à trouver avec ϕ_{Δ} .

IV Le photosensibilisateur

IV.1) Photosensibilisateurs de première génération

Les PS appartiennent à des familles très diverses[177, 181] ; ceux qui sont utilisés cliniquement appartiennent principalement à la famille des porphyrines[182, 183].

Le tout premier PS a été le psolarène qui est aujourd'hui répertorié sous la formulation PUVA précédemment mentionnée, et utilisé exclusivement en dermatologie. L'absorption dans le bleu, la faible valeur de ϵ et l'absence de ciblage limitent son utilisation aux seules applications cutanées. Il est utilisé pour le traitement du psoriasis. Le psolarène se démarque des autres photosensibilisateurs approuvés par les grandes instances sanitaires qui sont des dérivés de porphyrines, et plus précisément des dérivés de l'hème.

L'hème est un complexe ferreux de porphyrine. C'est le constituant actif de l'hémoglobine, responsable de la couleur caractéristique rouge du sang. Sous traitement (mélange acide sulfurique/acide acétique), Lipson et Baldes ont éliminé le fer complexé au centre du macrocycle, conduisant à la formation d'un mélange de composés dérivés d'hématoporphyrine (HpD). En 1909 Hasselbach rédigea le premier rapport sur le caractère phototoxique de HpD en travaillant sur des souris. En 1913, bien avant la compréhension exacte des mécanismes de PTD, la nature photosensibilisatrice de HpD avait été identifiée par Meyer-Betz qui s'était auto-inoculé 200 mg de cette substance, générant un œdème spectaculaire sur l'ensemble des régions exposées à la lumière (Figure C- 13). La photosensibilité avait perduré pendant près de deux mois.

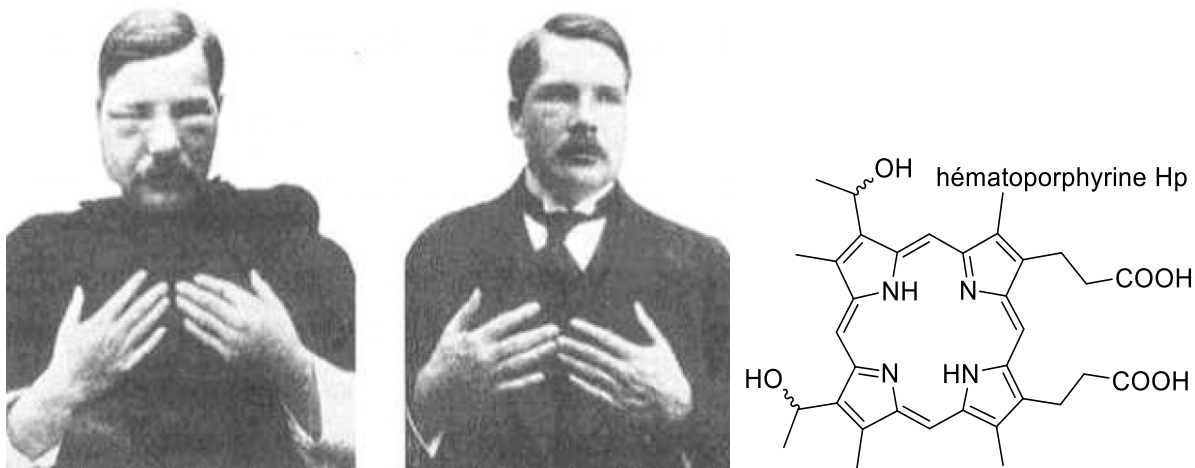


Figure C- 13 : Meyer après injection de HpD (gauche après bain de soleil, droite cinq jours après).

Des études postérieures menées par Lipson confirmèrent que HpD possède une sélectivité pour les tissus tumoraux (cancer du poumon) ainsi que la possibilité de faire de l'imagerie.

Toutefois, l'HpD, sous sa forme initialement isolée et testée avec succès sur le rat dès les années 1970, n'a pas pu trouver de débouchés cliniques, du fait de la présence de nombreuses impuretés et composés non identifiés dans la formulation. Néanmoins, un dérivé purifié correspondant à un mélange de deux régioisomères identifiés d'hématoporphyrine et présentant une accumulation particulièrement spécifique au sein des tissus tumoraux, a pu être obtenu à la fin des années 1970 par Thomas Dougherty. C'est ce mélange qui a été commercialisé dès 1987 pour un usage vétérinaire sous le nom PhotofrinII® (Draxis Pharma) ou PhotoBarr® (Axcan Pharma), fraction enrichie des composés actifs de HpD, avec un maximum d'absorption à 630 nm et un ϵ de 1200. HpD possède des caractéristiques physicochimiques (taille, forme, lipophilie) qui lui confèrent une excellente affinité pour les cellules cancéreuses, ce qui permet son accumulation sélective au sein des tissus tumoraux. Cette formulation (Figure C- 13), autorisée chez l'homme depuis 1993

(Canada) pour le traitement du cancer de la vessie, puis par la suite pour d'autres types de tumeurs (poumons, œsophage..) est restée jusqu'en 2000 le seul photosensibilisateur cliniquement approuvé pour la PTD de type II.

Cependant HpD ne répond pas à nombre de critère du cahier des charges :

- Molécule non pure, mélange de molécule avec une préparation de formulation faiblement reproductible,
- Faible absorption dans la fenêtre de transparence biologique,
- Demi-vie de circulation longue avec une période de photosensibilisation de 30 jours à trois mois.

IV.2) Nouvelle génération de photosensibilisateurs

Après 1993, les scientifiques ont développés de nouvelles génération de photosensibilisateurs, qui, si elles sont toujours basées sur des structures de type porphyrine, utilisent des stratégies visant à améliorer la conformité de ces dernières au cahier des charges exposé.

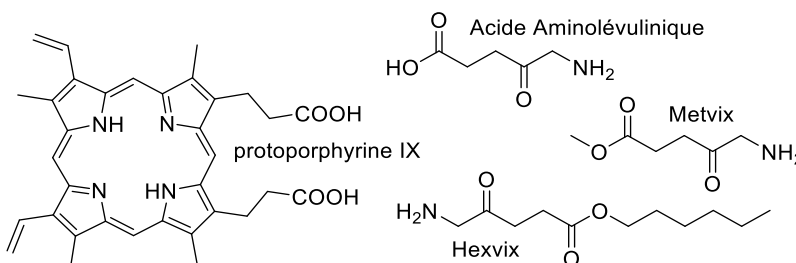


Figure C- 14 : Exemple de biosynthèse.

IV.2.a) La biosynthèse de porphyrine par utilisation de pro-drogues

La biosynthèse de l'hème comporte un grand nombre d'étapes avec de nombreux intermédiaires de type porphyrine. Cette synthèse démarre par la formation de d'acide 5-aminolévulinique à partir d'une réaction entre la glycine et le succinylCoA (réaction activée par l'enzyme 5-Ala-synthétase). Une succession de déshydratations puis de condensations permet d'obtenir un dérivé de porphyrine de l'hème : la protoporphyrin IX (Figure C- 14). L'hème est obtenu par métallation de cette dernière par le Fe^{II} grâce à la ferrochelatase. La concentration de l'hème est contrôlée autour de 10^{-8} à 10^{-7}M dans l'organisme. Pour cela un rétrocontrôle régule l'activité de la 5-Ala-synthétase grâce à un cofacteur. La stratégie est d'utiliser une pro-droque (c'est-à-dire une molécule non-

toxique ne possédant aucune activité et dont la métabolisation va générer une molécule active in-vivo) pour « tromper » l'organisme. L'administration d'acide 5-aminolévulinique va ainsi permettre de court-circuiter le rétrocontrôle sur la 5-Ala-synthétase. Les différentes étapes de formation de l'hème sont donc déplacées et la protoporphyrin IX est générée à haute concentration dans le tissu traité. L'acide 5-aminolévulinique (5-Ala, ou Levulan®) a obtenu de bons résultats en traitements cliniques, recevant une autorisation de mise sur le marché en 1999[184]. Ses principaux avantages viennent de l'innocuité du précurseur, de son élimination aisée par les voies naturelles et de la rétention préférentielle au sein des tissus tumoraux de la porphyrine. L'hydrophilie de l'acide 5-aminolévulinique est une des limitations du traitement car elle limite la pénétration au sein de la membrane cellulaire. Des dérivés estérifiés ont été synthétisés pour augmenter le caractère lipophile. Le dérivé méthylé MAL (Metvix) a respectivement été approuvé en 2001 (Nouvelle-Zélande pour le traitement de cancers de la peau) et en 2009 (Etats-unis pour le traitement du cancer de l'intestin et de la vessie) et le dérivé hexylé HAL (Hexvix) pour faire de l'imagerie. Ces composés possèdent un pouvoir de perméation très supérieur et sont métabolisés de manières similaires. Les limitations restent celles des porphyrines comme HpD ; les propriétés d'absorption médiocres (ϵ , λ_{abs}) limitent leur utilisation à des traitements de surface. Pour améliorer la pénétration des traitements, les propriétés d'absorption $\epsilon > 10^4 \text{ L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ et $\lambda_{abs} > 650 \text{ nm}$ doivent être obtenues.

IV.2.b) Optimisation de propriétés d'absorption : dérivation des porphyrines

Pour conserver les propriétés de sélectivités des porphyrines tout en optimisant leurs propriétés spectroscopiques, des modifications ont été apportées sur le macrocycle pyrrolidique, soit par réduction de doubles liaisons, soit par modification de la structure (remplacement des pyrroles par d'autres groupes), soit enfin par la substitution de ces derniers (Figure C- 15).

La réduction d'une des doubles liaisons conduit à un macrocycle de type chlorine. Si une seconde double liaison est réduite on parle de macrocycle de type bactérochlorine. Ces structures peuvent être modifiées avec l'ajout de cycles accolés comme les phéophorbides et les bactériophéophorbides. D'autres modifications plus profondes sur la structure comme la modification des pyrroles sont possibles comme pour la famille des phtalocyanines ou celles des texaphyrins[130].

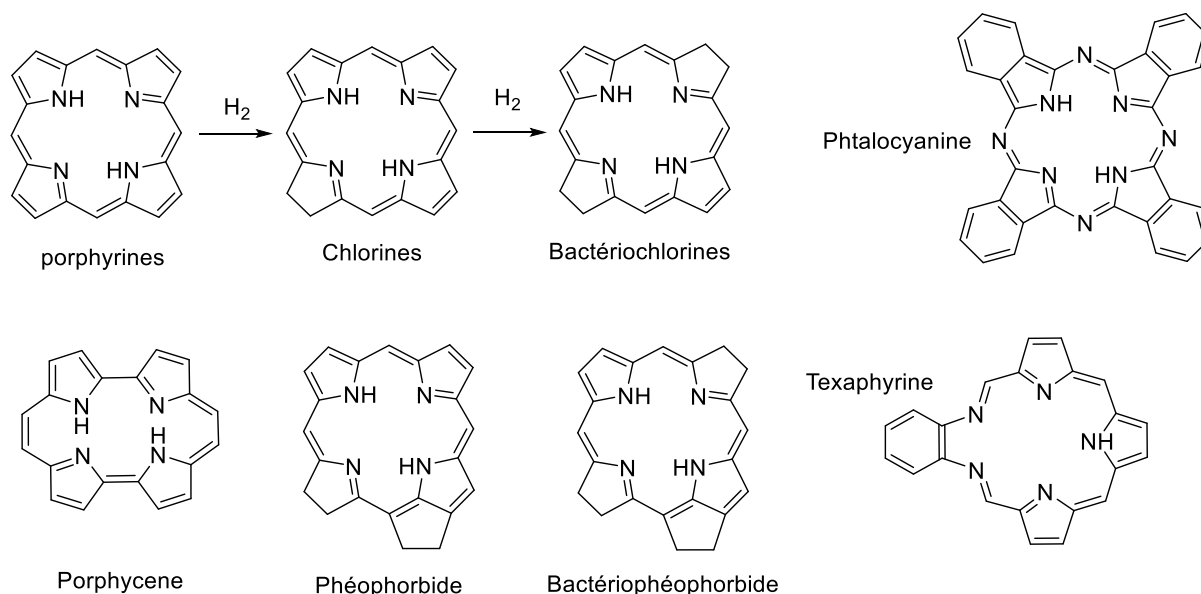


Figure C- 15 : Exemples de structure dérivant des porphyrines.

IV.2.b.i) Les chlorines et dérivés

Cette classe de molécules présente des absorptions vers 650-670 nm, avec des coefficients d'extinctions molaires supérieurs à $10^4 \text{ L.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Figure C- 16). Les chlorines peuvent être issues de systèmes biologiques comme la chlorophylle a, ou bien synthétisé comme la chlorine e6 naturelle dérivée de la chlorophylle a.

A titre d'exemples de chlorines approuvées et utilisées dans des traitements cliniques on peut citer :

- la Temoporphyne, mTHPC ou FoscanTM (*Biolitec Pharma*), utilisée en Europe depuis 2001 pour les cancers du visage, du cou, de la prostate et du pancréas,
- la Verteporphyn (Visudyne[®], *Novartis*) qui est désormais utilisée en traitement de première ligne de la DMLA (approuvé depuis 2000 aux USA),
- la Talaporphyne (Choline e6, Laserphyrin[®]), (*Meiji Seika Kaisha*) approuvée au Japon depuis 2004 pour le traitement des cancers du poumon en essais cliniques de phase III et pour le cancer colo-rectal sous le nom AptocineTM.

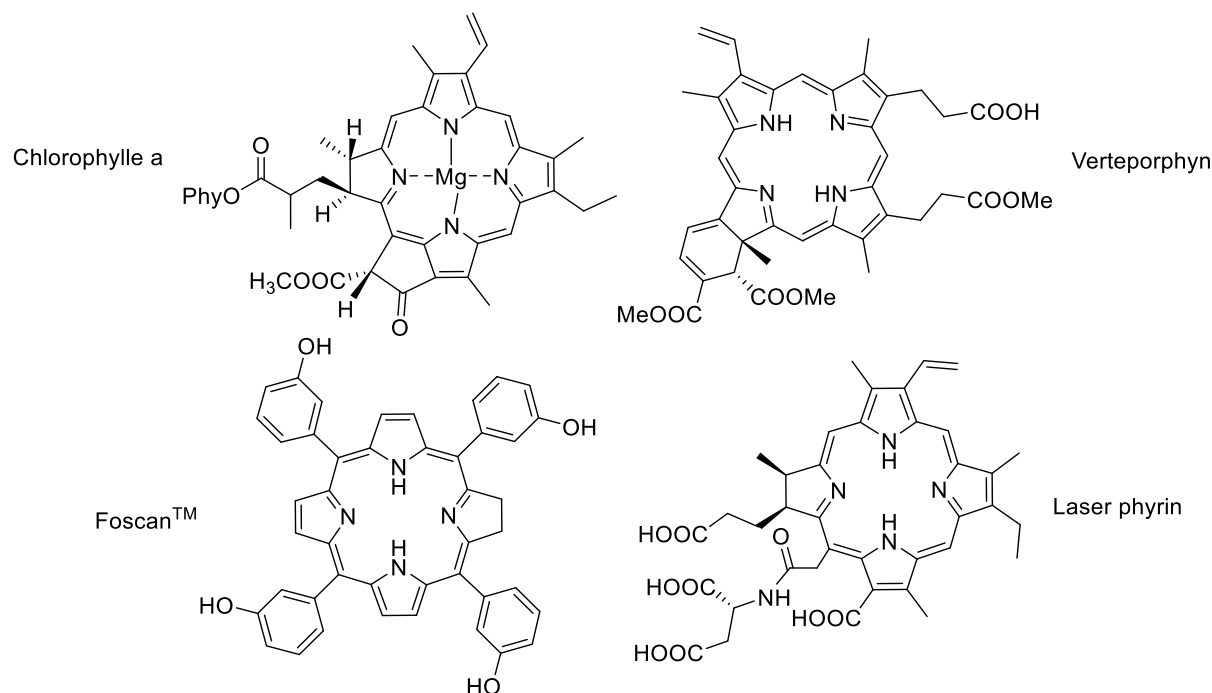


Figure C- 16 : Exemple de dérivés de chlorine.

IV.2.b.ii) Les bacteriochlorines et dérivés

Ces molécules présentent des absorptions vers 730-800 nm au sein de la fenêtre de transparence biologique tout en restant de bons générateurs d'oxygène singulet. Des travaux sur la dérivation d'un précurseur naturel la chlorophylle-a permettent de décaler la longueur d'onde d'absorption dans la FTB (Figure C- 17)[185]. Cependant, la plupart des dérivés sont aujourd'hui métallés avant leur utilisation en phase clinique. La stabilisation par coordination d'un centre métallique permet de limiter les phénomènes d'oxydation et est utilisée pour d'autres structures[186] Figure C- 17.

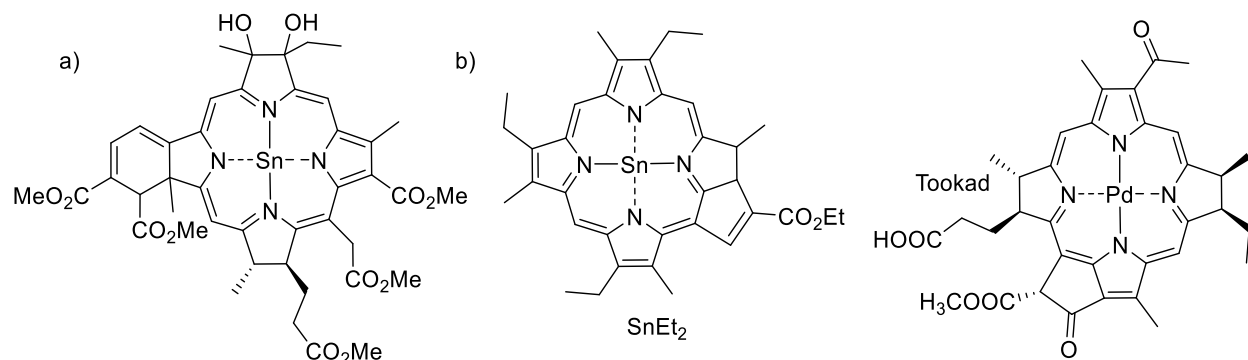


Figure C- 17 : a) exemple de bactériochlorine, b) exemple de chlorine et de bactériochlorine avec un centre métallé.

IV.2.b.iii) Les phtalocyanines et porphyrines à cœur étendu.

Les phtalocyanines, en dépit de propriétés de génération d'oxygène singlet sensiblement plus faibles, présentent une absorbance encore supérieure aux chlorines dans le proche infrarouge mais également une fluorescence résiduelle plus intense, deux points très importants pour les applications cliniques[187-191]. Des études cliniques en cours en Russie sur un mélange bi et tri-sulfonaté (*Photosens*[®])[192], ont montré des résultats très prometteurs dans le traitement de cancers de la peau et de l'œsophage. La phtalocyanine Pc-4 montre des résultats suffisamment bons pour envisager un traitement chez l'homme[189]. Des porphyrines à cœur étendu comme le Lutex[®] apparaissent comme une nouvelle stratégie pour développer de futur PS.

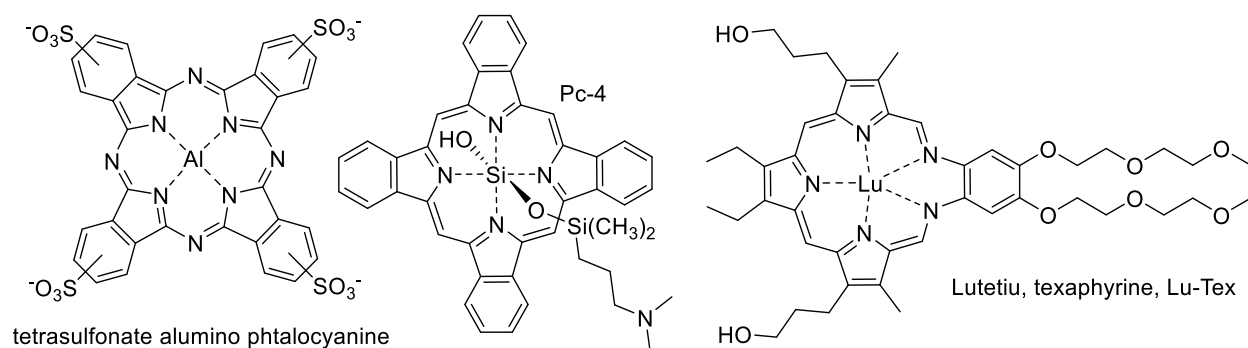


Figure C- 18 : Phtalocyanines et porphyrines à cœur étendu.

IV.2.b.iv) Photosensibilisateur non dérivé des porphyrines

Dans ce paragraphe, les molécules données en exemples n'ont pas encore été approuvées pour des applications biomédicales. Cependant ces molécules ouvrent de nombreuses pistes pour l'amélioration et la diversification du traitement PTD via l'utilisation de nouvelles structures. Des composés comme le bleu de méthylène, l'éosine Y et le rose Bengale possèdent des rendements de génération d'oxygène singlet élevés[193]. De nombreux autres chromophores, similaires à ceux utilisés en imagerie du fait de leur propriétés d'absorption notamment dans la FTB, ont été modifiés afin de les rendre générateurs d'oxygène singlet. Contrairement aux porphyrines, le couplage spin-orbite est provoqué par l'introduction d'un atome lourd, suivant deux approches principales. La première consiste à jouer sur la substitution de l'oxygène par d'autres éléments de la colonne 17 du tableau périodique (S, Se, Te). Des exemples sur des dérivés de rosamide[160], chalcogenopyryliums[160, 194] et squarine[195] sont donnés Figure C- 19. La seconde approche consiste à introduire des substituants halogène sur la structure de chromophores dérivant de

BODIPY[196, 197], fluorène[198], cyanine[199], merocyanine 540[200] ou encore de rhodamine[181].

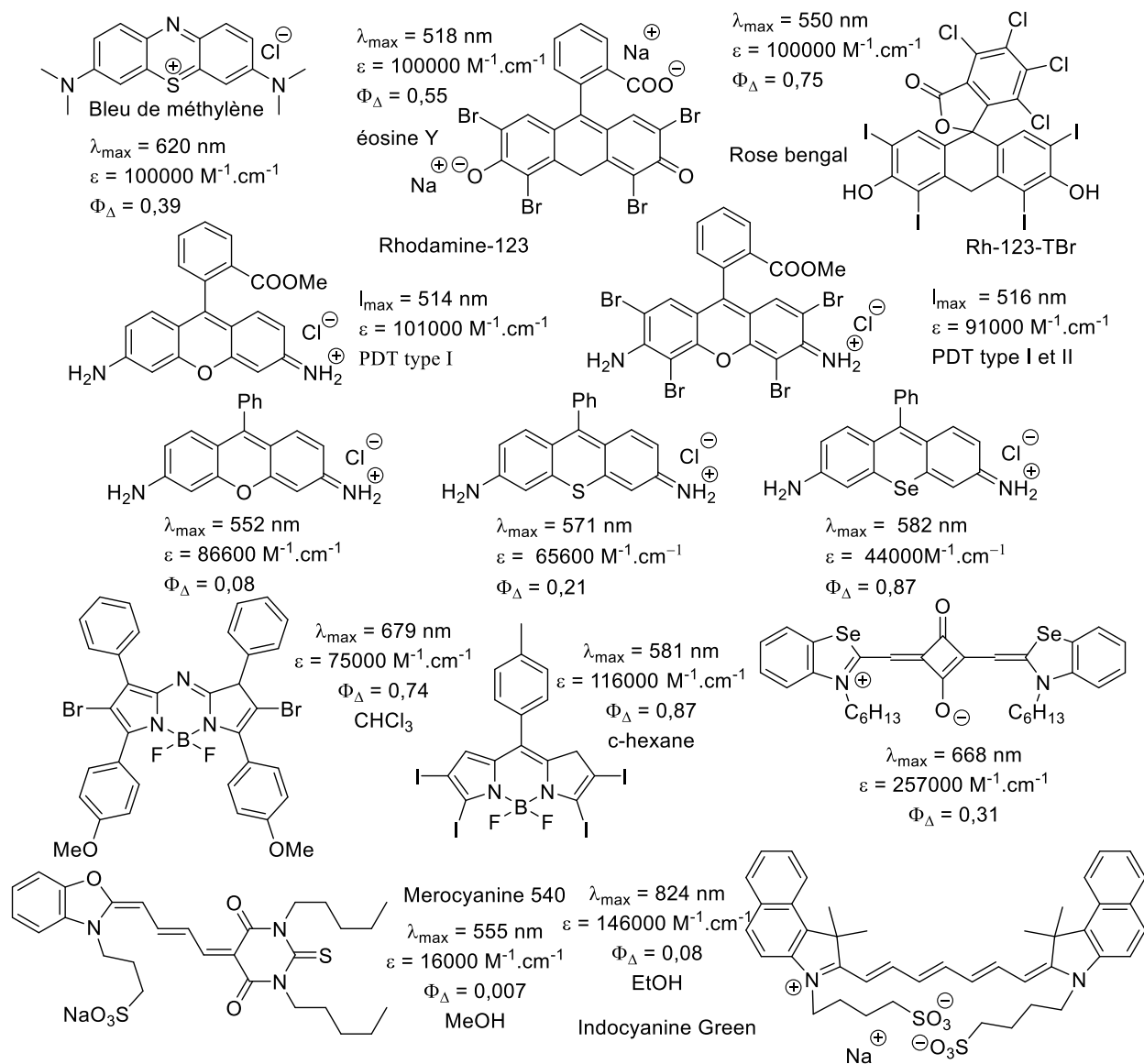


Figure C- 19 : Exemple de chromophores pour la PDT non-dérivés de porphyrine.

IV.3) Limitation actuelle

La plupart des PS présentent des inconvénients qui nuisent à un développement clinique plus généralisé de la PDT. Bien que leur temps de demi-vie dans l'organisme (10-15 jours) soit sensiblement plus court que dans le cas des traitements à base de Photofrin® (la chlorine étant plus aisément métabolisée que la porphyrine), la photosensibilisation induite est nettement plus marquée, ce qui peut entrainer des complications sérieuses en cas d'exposition à la lumière dans

les jours suivant le traitement. Par ailleurs, chez certains sujets, l'injection peut s'avérer douloureuse (FoscanTM, Visudyn[®]) et des réactions allergiques ont parfois été rapportées (PurlytinTM). Une des perspectives majeures d'évolution de la recherche actuelle dans le domaine consiste donc à réduire tout ou partie de ces inconvénients, en tentant en particulier de circonscrire plus précisément l'action du traitement sur le volume tumoral à traiter.

IV.4) Bilan

Les recherches en cours s'articulent autour de deux objectifs. Le premier est l'accumulation sélective et exclusive du photosensibilisateur dans le volume tumoral à traiter[201]. Ces questions seront abordées de manière générale au chapitre 4 (photosensibilisateur de troisième génération). Le second est de limiter la zone d'irradiation du photosensibilisateur à ce même volume. Pour répondre à ce second objectif l'utilisation de l'ADP apparaît être une technique de choix. Le principe de l'ADP a déjà été discuté. La combinaison PTD-ADP fait l'objet du chapitre 2.

Chapitre n°2 : **Ingénierie moléculaire** **pour des** **chromophores pour la** **PTD-ADP**

I La PTD à deux photons

I.1) Principe de la photothérapie biphotonique

Le phénomène conduisant à la photosensibilisation de l'oxygène dans le cadre d'une absorption biphotonique est schématisé Figure 2- 1. Trois paramètres clés vont déterminer l'efficacité de ce phénomène. La constante cinétique de croisement inter-système k_{ISC} et le transfert d'énergie (TE) ont déjà été évoqués en introduction générale, dans le cadre de la PTD à un photon. Ces deux termes difficilement quantifiables individuellement avec une précision suffisante peuvent l'être collectivement en mesurant l'efficacité quantique de génération d'oxygène singulet (φ_{Δ}). Le troisième paramètre ajustable est la section efficace d'ADP (σ_{ADP}). De manière similaire au paramètre de brillance dans le cadre de la microscopie à deux photons, le potentiel d'un chromophore en PTD-ADP sera donc caractérisé par la figure de mérite ($f = \varphi_{\Delta} \times \sigma_{ADP}$), exprimée en GM. Ce paramètre est généralement indiqué dans la littérature pour une longueur d'onde donnée (entre 800 et 850 nm), qui correspond aux longueurs d'ondes d'utilisation optimale des lasers titane-saphir. Afin d'optimiser ce paramètre f , il est donc possible de jouer sur les deux facteurs distincts: l'optimisation de l'ADP et/ou l'optimisation de la génération d'oxygène singulet, et par conséquent la génération de l'état triplet. Corollairement, deux approches d'ingénierie moléculaire sont possibles. On peut étendre la conjugaison (alternativement : insérer des « antennes » absorbant à deux photons) autour de groupes générant de l'oxygène singulet (typiquement des porphyrines) ou accroître la force des substituants donneurs et/ou accepteurs, de façon à optimiser σ_{ADP} ; alternativement on peut envisager d'insérer des atomes/groupements générateurs d'oxygène singulet (typiquement des atomes lourds) sur une structure optimisée pour l'absorption à deux photons, de façon à optimiser φ_{Δ} .

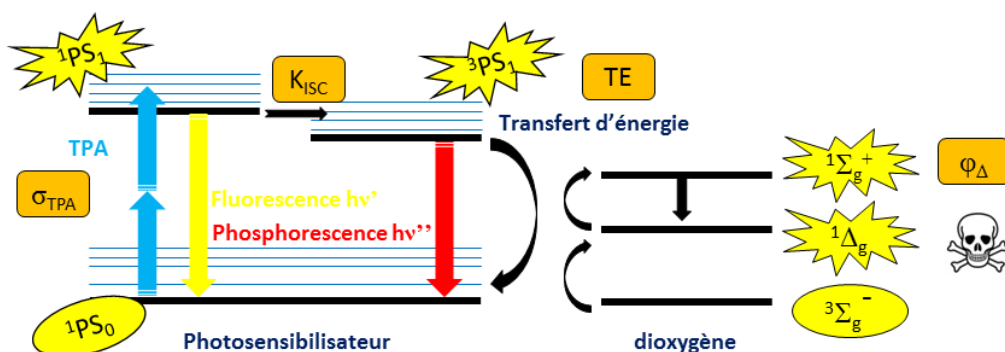


Figure 2- 1 : Principe de la PTD-ADP.

I.2) Les avantages de l'absorption à deux photons pour la PTD

L'ADP permet de résoudre certaines des limitations abordées au paragraphe I.B[13].

L'ADP permet tout d'abord de décaler l'absorption dans le proche infra-rouge pour avoir une meilleure pénétration au sein des tissus, paramètre particulièrement important dans le traitement des tumeurs solides (c'est-à-dire épaisses). L'utilisation de l'ADP permet en effet aux molécules absorbant linéairement entre 350 et 600 nm, d'absorber autour de 700-1200 nm, soit au cœur de la zone de transparence biologique. D'un point de vue technique, l'efficacité maximale du chromophore doit être située dans la fenêtre spectrale 750-950 nm qui correspond à celle couverte par le laser accordable Ti-saphir généralement utilisé en biophotonique. Le second avantage de ce décalage est qu'on limite les phénomènes de relaxations vibrationnelles à partir de l'état S_1 , qui sont importants pour un chromophore absorbant à un photon dans le proche infra-rouge, limitant leur brillance.

L'utilisation de l'ADP permet par ailleurs une meilleure localisation du traitement appliqué. Tout comme dans le cadre de l'imagerie tridimensionnelle par microscopie à deux photons (chapitre 3), la dépendance quadratique de l'ADP à l'intensité d'irradiation limite le phénomène au point focal du laser, permettant une résolution de l'ordre du μm : contrairement à l'activation à un photon, qui risque d'activer le traitement le long du trajet optique, cette résolution permettra un traitement localisé au tissu tumoral.

Par ailleurs, la grande majorité des molécules actives à deux photons absorbent plus faiblement dans le visible que les photosensibilisateurs classiquement utilisés à un photon (porphyrines) qui possèdent des coefficients d'absorption molaire très élevés. Cette propriété permet de réduire le délai pendant lequel les patients doivent rester protégés des rayons lumineux du soleil après traitement.

I.3) Les premiers chromophores étudiés pour la PTD-ADP

Dans une étude visant à démontrer le bénéfice d'une excitation biphotonique par rapport à une excitation à un photon, Wachter et coll ont comparé les propriétés d'absorption et d'émission de différents dérivés de psoralène soumis à des excitations à un photon vs deux photons (Figure 2-2)[202]. Malgré l'absence d'optimisation structurelle réelle, les propriétés photosensibilisatrices

de type I de ces dérivés ont pu être mises en évidence sous activation à deux photons. Les mêmes auteurs ont apportés une preuve de principe de PTD-ADP in-vitro sur des cellules de *Salmonella typhimurium*. L'étude a mis en évidence l'intérêt d'utiliser une source laser pulsée pour réduire les dommages induits uniquement par l'irradiation. Enfin, la possibilité d'appliquer des traitements en profondeur dans un milieu optiquement dense (gel d'agarose dopé à la Coumarin-480) a été observée. Dans un tel milieu, il est possible d'imager sur 2cm de profondeur, soit l'épaisseur totale de l'échantillon, et la localisation de la fluorescence se fait uniquement au point focal du laser (Figure 2- 2). Ces observations ne sont que des preuves de concept : atteindre une profondeur de deux centimètres reste un objectif assez lointain dans les milieux biologiques.

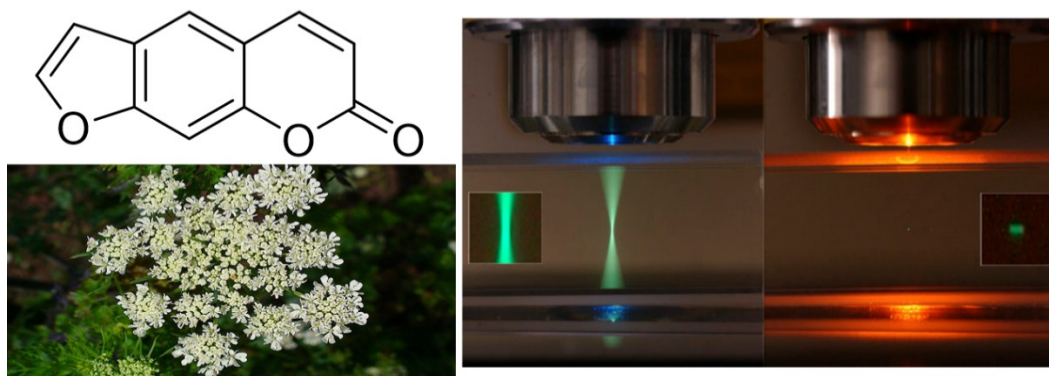


Figure 2- 2 : Représentation du psoralène et exemple de plante en contenant (petite ciguë). Mise en évidence de la localisation au point focal d'un laser d'une solution de fluorescéine.

Suite à ces travaux pionniers, d'autres photosensibilisateurs classiquement utilisés à un photon ont été étudiés dans le cadre d'excitations biphotoniques. Wilson et coll. ont développé des protocoles de microscopie de fluorescence pour déterminer l'efficacité des photosensibilisateurs à deux photons, en évaluant l'efficacité de la photofrin dans le cadre du traitement à deux photons de la DMLA[203]. Ils ont pu apporter une preuve de concept de l'utilisation de l'ADP pour l'excitation de photosensibilisateurs utilisables cliniquement. Ce protocole a été utilisé pour comparer l'efficacité de la photofrin et de la visudyne, photosensibilisateurs classiquement utilisés en PTD à un photon par activation biphotonique pour induire la mort cellulaire[204]. La visudyne a montré de bien meilleures propriétés que la photofrin (Figure 2- 3).

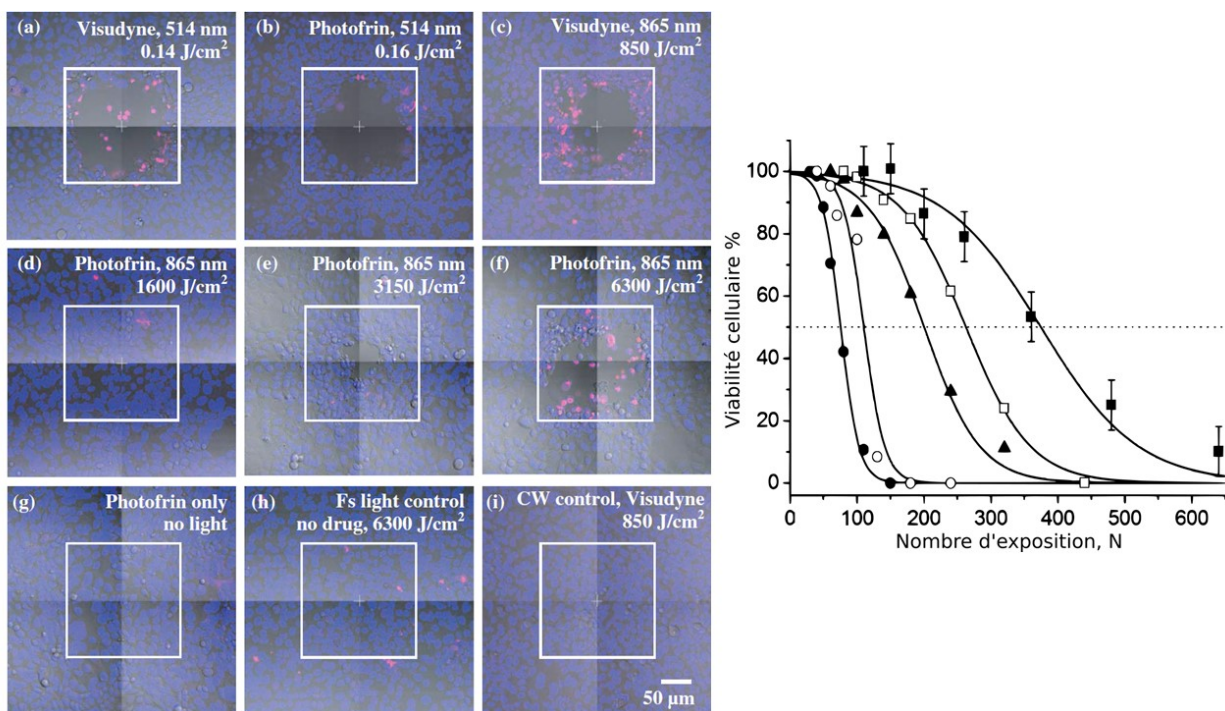


Figure 2- 3 : Détection de la fluorescence noyau de cellule (bleu : Hoechst 33258), des cellules dont la paroi cellulaire est perméable (rose : SYTOX Orange). a,b) action à un photon c,d,e,f) action à deux photons en fonction de la puissance du laser g) control sans lumière h) control sans photosensibilisateur i) contrôle en utilisant un laser en mode continue.

Stringer et coll ont mené des études similaires sur la m-THPC, avec des conclusions comparables quant aux avantages de l'activation biphotonique pour le traitement[205]. Afin de rationaliser le phénomène, Heyne et coll ont entrepris la mesure des sections efficaces de m-THPC et m-THPP entre 1,05–1,45 μm (Figure 2- 4)[206].

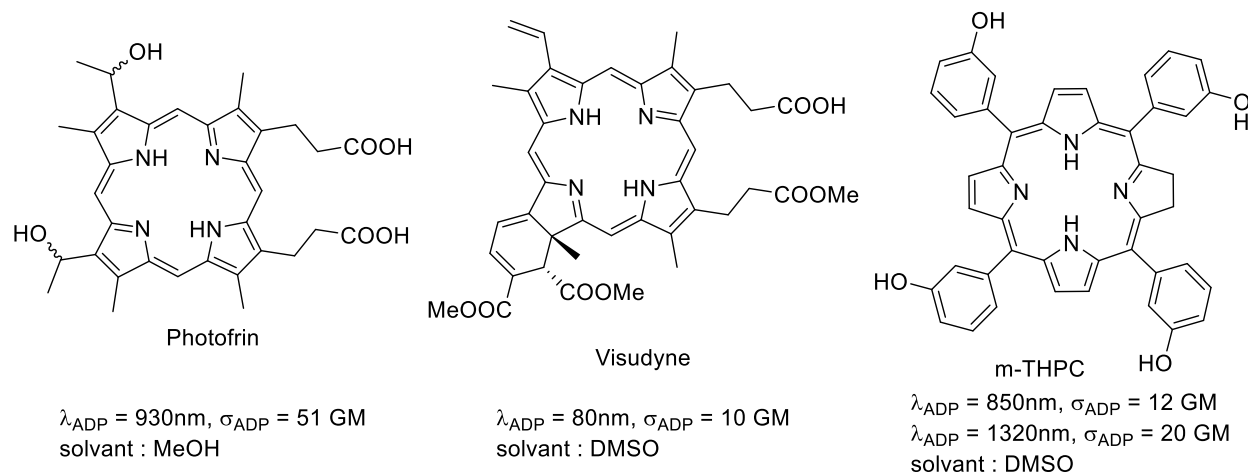


Figure 2- 4 : Efficacité de porphyrine en absorption à deux photons.

Dans ces PS cliniques, toutefois, les valeurs de section efficace d'ADP mesurées restent faibles : ces dérivés ne possèdent en effet pas le caractère de transfert de charge requis pour exalter

l'absorption biphotonique. L'accroissement de la section efficace apparaît donc comme un objectif majeur pour permettre une utilisation clinique de la PTD à deux photons.

I.4) Etat de l'art de chromophore pour la PTD-ADP

Une première approche a donc porté sur la modification chimique de chromophores générant intrinsèquement de l'oxygène singulet en vue d'optimiser leur section efficace.

La famille des porphyrines, classe de molécules à l'origine de la quasi-totalité des photosensibilisateurs cliniquement approuvés pour des applications de PTD à un photon, a été particulièrement mise à profit. Les travaux d'ingénierie moléculaire relatifs ont exploré différentes stratégies :

- Une première stratégie consiste en la sensibilisation d'une porphyrine par transfert d'énergie de type FRET à partir d'une antenne absorbant à deux photons (Figure 2- 5). Des systèmes ont été développés mettant en jeu soit un lien covalent entre la porphyrine et l'antenne, soit en les mettant en contact par confinement au sein d'objets hybrides (notamment nanoparticules de silice)[207].

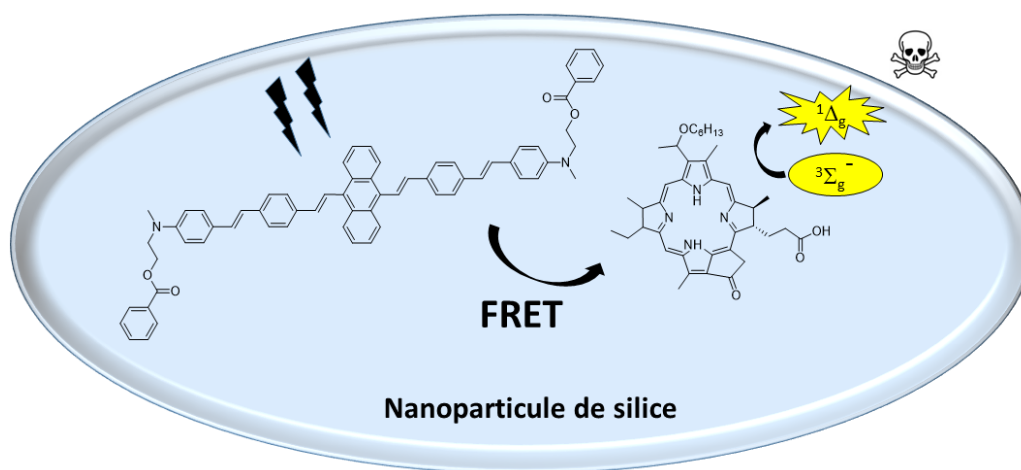


Figure 2- 5 : FRET entre un chromophore absorbant à deux photons et une porphyrine grâce à la proximité spatial au sein d'une nanoparticule de silice.

You and coll ont montré que l'association covalente entre une porphyrine et une antenne de type rhodamine permettait d'obtenir une valeur de la section d'ADP de 40 GM à 800 nm, sensiblement optimisée par rapport à la porphyrine seule (TPP-OH) 16 GM à 800 nm[208]. Prasad and coll ont utilisé des antennes FRET possédant une section efficace à deux photons très importante (>8000 GM), dont le rattachement à un cœur porphyrine

suivant une approche pseudo-dendritique permet la génération d'oxygène singlet par excitation à deux photons à 780 nm, alors qu'à cette longueur d'onde, la porphyrine seule ne gère pas d'oxygène singlet [209]. Cette stratégie permet donc d'activer le photosensibilisateur dans la fenêtre de transparence biologique.

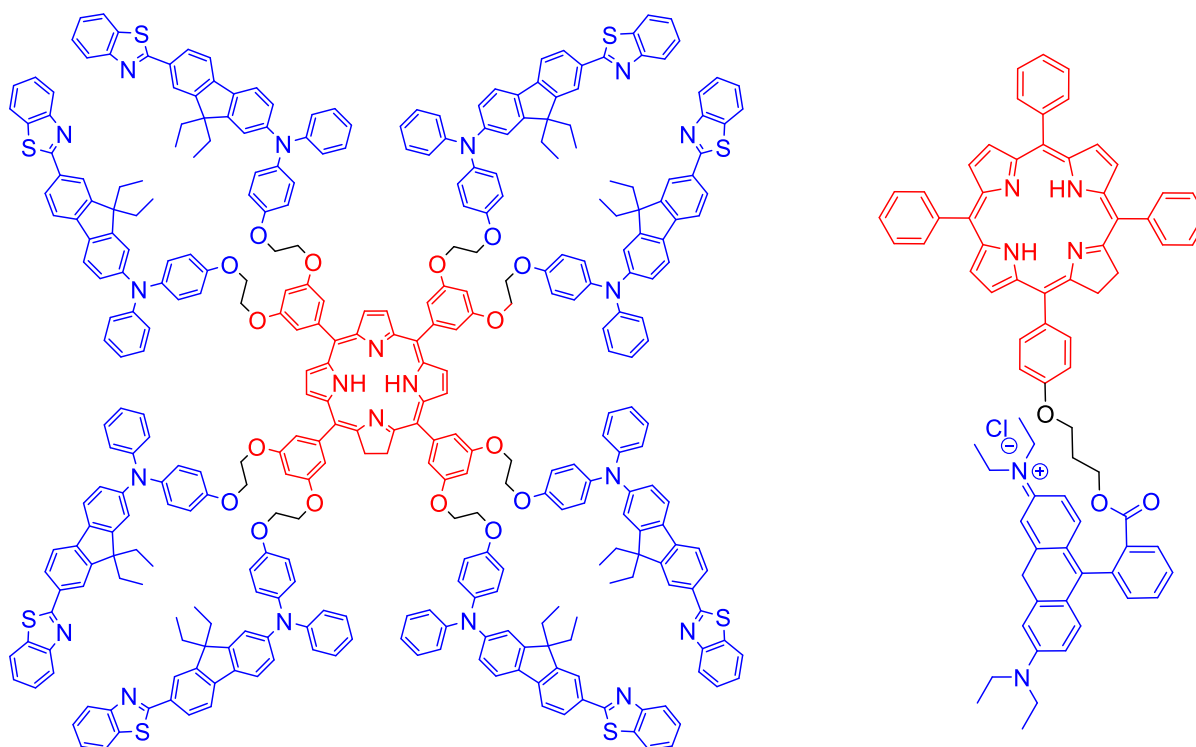


Figure 2- 6 : Exemple d'activation d'une porphyrine génératrice d'oxygène singlet (rouge) par effet d'antenne (bleu) absorbant à deux photons : gauche) antenne dipôle, droite) antenne rhodamine.

- La seconde stratégie repose sur l'extension du système π directement autour des macrocycles porphyrines. Schmitt et al ont montré l'effet de la conjugaison de groupements diketopyrrolopyrroles sur une porphyrine de zinc[210]. L'allongement de la conjugaison permet d'augmenter la section efficace à $\lambda_{TPA}^{max} = 910$ nm de 2000 GM (mono-substitution) à 4000 GM (bi-substitution), alors que la porphyrine seule est inactive à deux photons après 800 nm. Par une approche similaire, Anderson et al ont obtenu des dimères

de porphyrine conjuguées par un espaceur diyne, conduisant à une section efficace pouvant atteindre des valeurs jusqu'à 17000 GM[211].

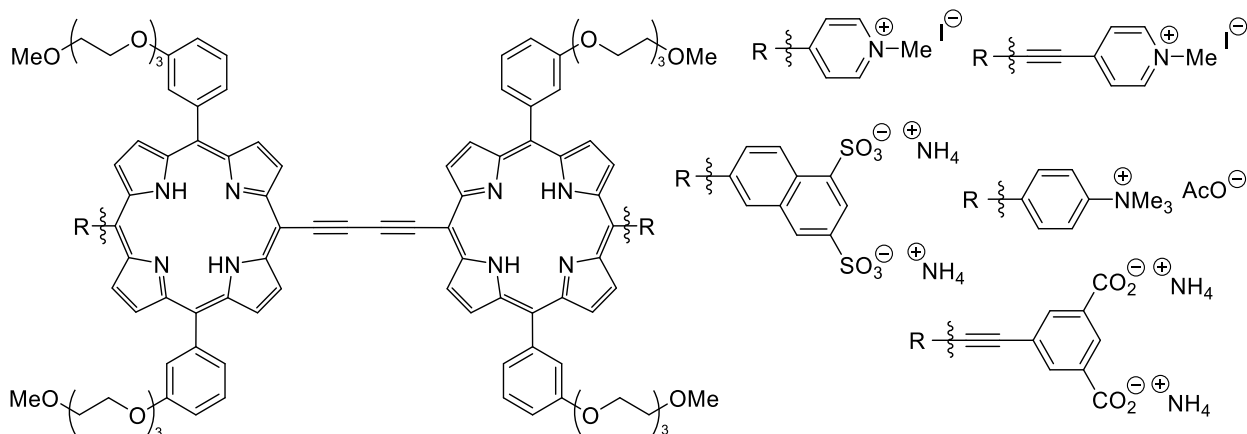


Figure 2- 7 : Exemple d'extension d'un système π de porphyrine pour la PTD.

Ce chromophore fonctionnalisé par des groupements hydrosolubilisants adéquats (oligoéthylène glycol sur le cœur porphyrine, groupements cationiques en périphérie) a pu être utilisé avec succès pour générer une occlusion *in vivo* de vaisseau sanguin chez une souris, ce qui constitue probablement la preuve de concept la plus convaincante à ce jour de l'applicabilité clinique de la PTD à deux photons (Figure 2- 8)[149].

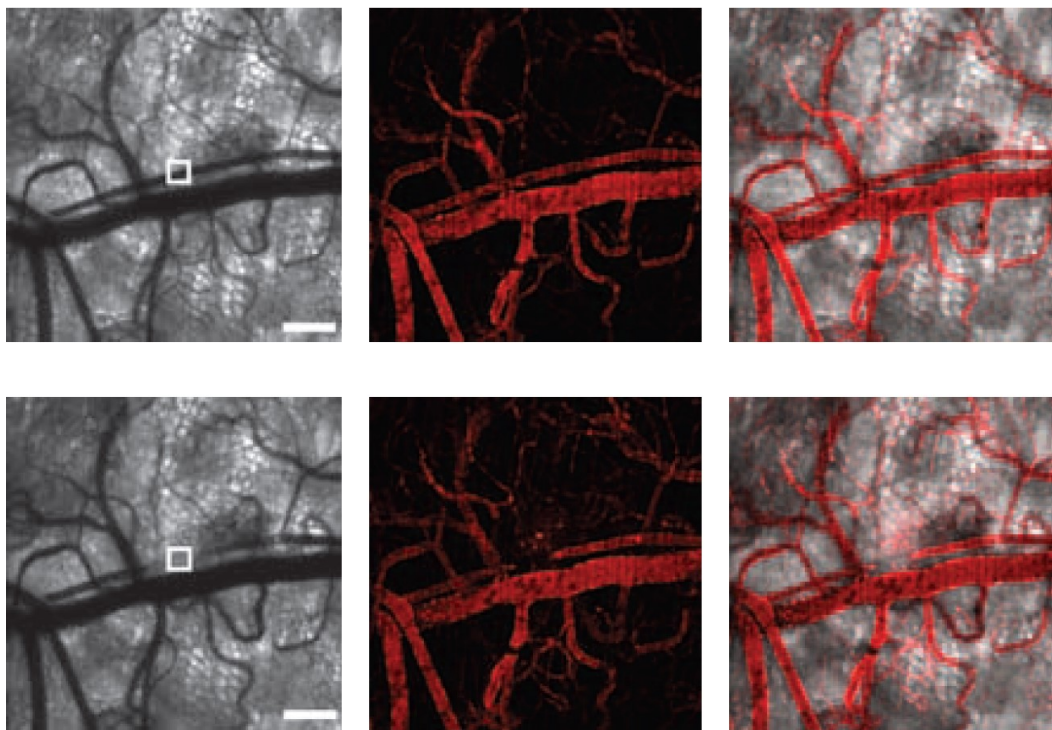


Figure 2- 8 : occlusion de faisceau sanguin : microscopie optique, microscopie de fluorescence, superposition des deux techniques.

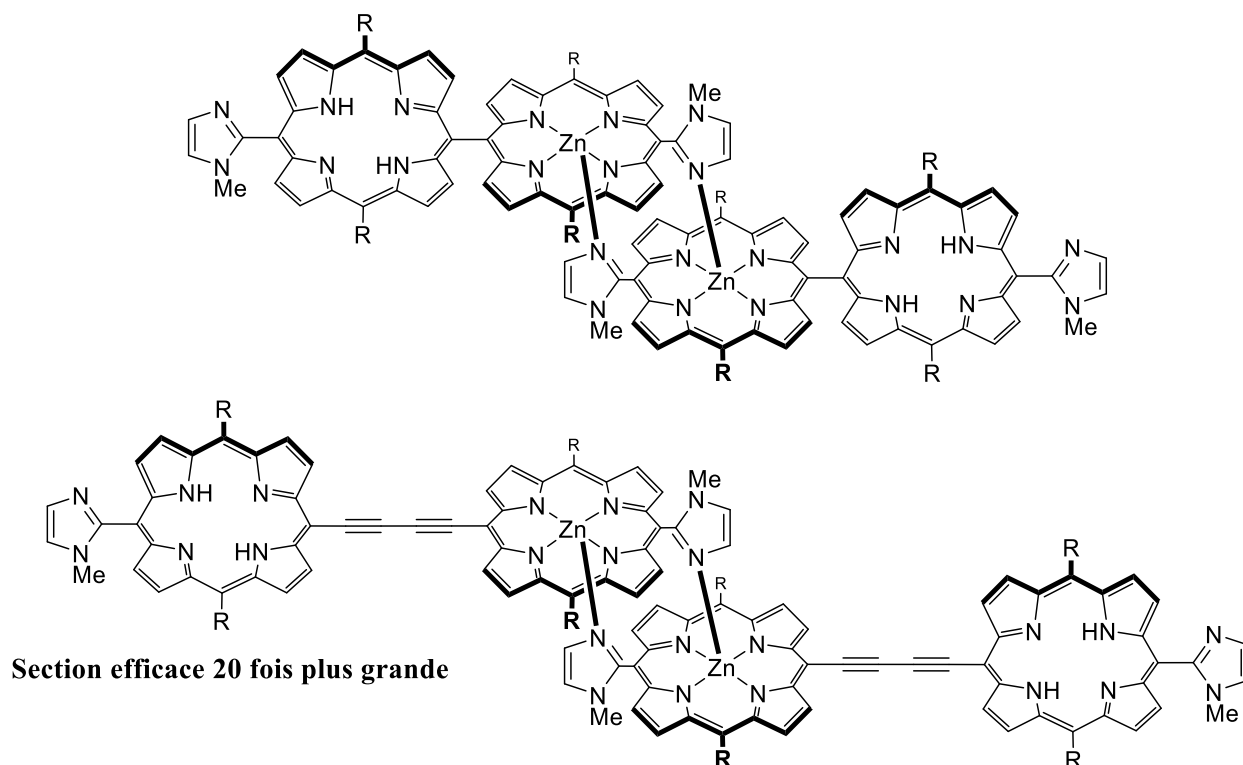


Figure 2- 9 : Effet d'un pont di-éthylène sur la section efficace.

Kokube et al. ont montré l'effet de l'augmentation de la longueur de la conjugaison sur des oligomères de porphyrines[212, 213]. L'introduction d'un pont di-yne à la place d'une liaison simple carbone-carbone entre deux cœurs porphyrines permet de multiplier par 20 la valeur de la section efficace (Figure 2- 9). Cependant ces molécules n'ont pas été utilisées dans le cadre de la PTD. Mongin et al ont comparé l'efficacité du FRET et de la conjugaison directe en utilisant un groupement identique des unités fluorènes comme antenne ou comme unité augmentant la conjugaison. La production d'oxygène singulet est assurée par une porphyrine TPP (Figure 2- 10). L'évolution de la section efficace d'ADP et de la génération d'oxygène singulet en fonction du nombre de fluorènes et du processus d'activation de la porphyrine a été étudiée[214]. Dans les deux cas, l'augmentation du nombre d'électrons autour de la structure permet d'optimiser la section efficace. L'augmentation est encore plus marquée dans le cas de la conjugaison directe. Dans le cas de l'allongement de la conjugaison, une faible augmentation du nombre d'électrons π permet d'optimiser la section efficace. Cette étude montre que la multiplication du nombre d'antennes permet de maximiser la section efficace. On passe ainsi d'une section efficace de 45 GM pour 8 antennes fluorènes à 75 GM pour 16 antennes. L'augmentation de la conjugaison a cependant plus d'influence sur la section efficace qui est de 90 GM pour uniquement 4 unités fluorènes. Les

oligomères permettent d'optimiser encore plus la section efficace. On peut noter que l'augmentation de la section efficace n'a d'intérêt que si φ_{Δ} est conservé. Il faut ainsi toujours vérifier l'évolution de ce paramètre et regarder l'évolution de la figure de mérite.

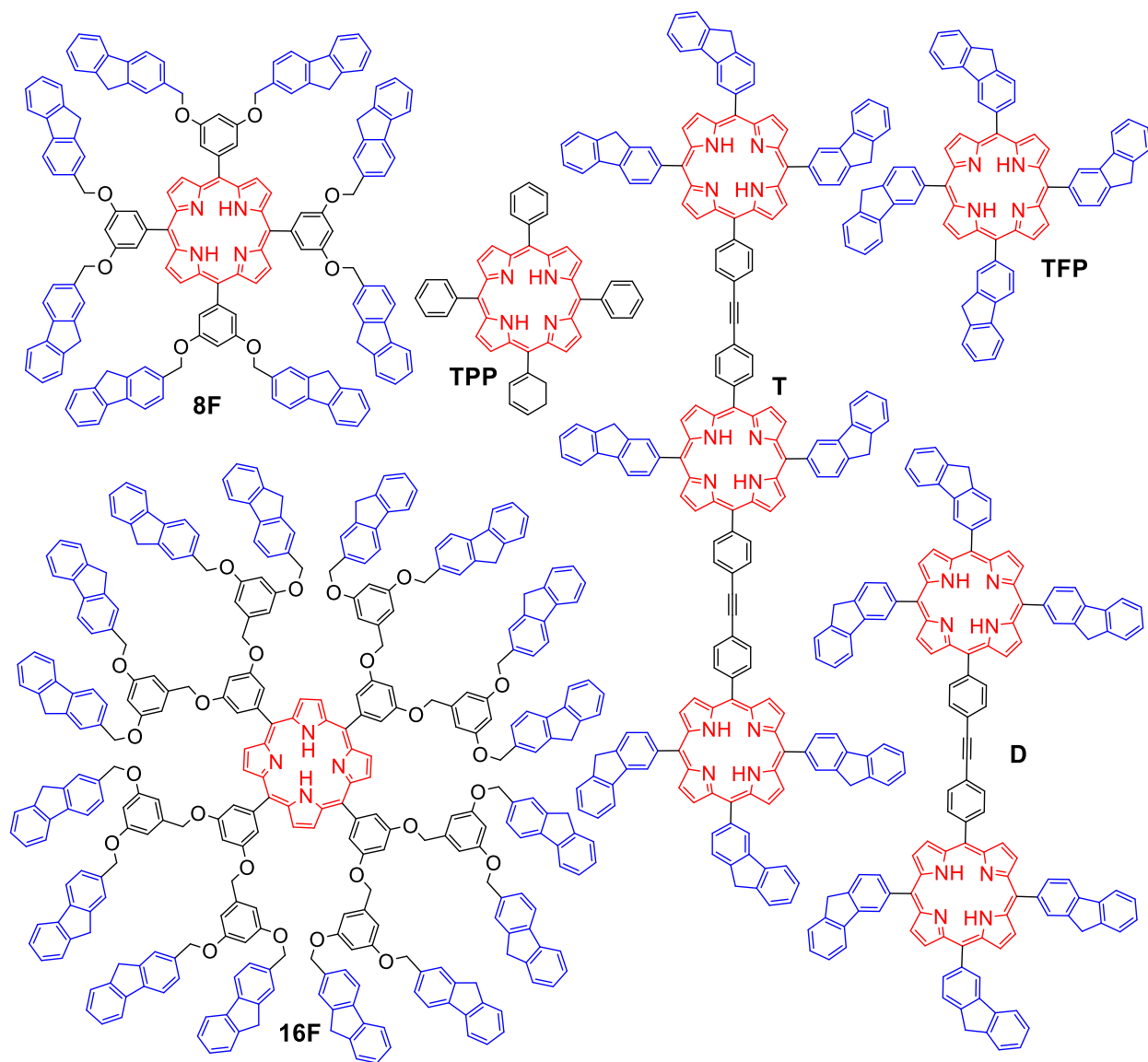


Figure 2- 10 : Comparaison FRET et conjugaison directe pour la PTD-ADP.

Composés	Fluorene/ porphyrine	λ_{ADP}^{max} (nm)	σ_{ADP}^{max} (GM)	φ_{Δ}	f (GM)
TPP	0	790	12	0,60	7
8F	8	790	45	0,64	29
16F	16	790	75	0,63	47
TFP	4	790	90	0,60	54
D	3	810	170	0,59	100
T	2,67	810	270	0,48	130

Tableau 2- 1 : Données spectroscopiques des molécules de la Figure 2- 10.

La structure porphyrine a également servi de base à plusieurs travaux d'ingénierie macrocyclique. Ogilby a développé des porphycènes, régioisomères des porphyrines, apportant la preuve de concept de l'intérêt de ce type de dérivé pour obtenir de grandes figures de mérite pour la PTD-ADP via une augmentation d'un ordre de grandeur de la section efficace d'ADP[215]. Les porphyrines à cœur étendu sont aussi des structures qui permettent d'obtenir de fortes valeurs de section efficace (Figure 2- 11). Cependant, la génération d'oxygène singulet de cette famille n'a pas été rapportée à ce jour dans la littérature.

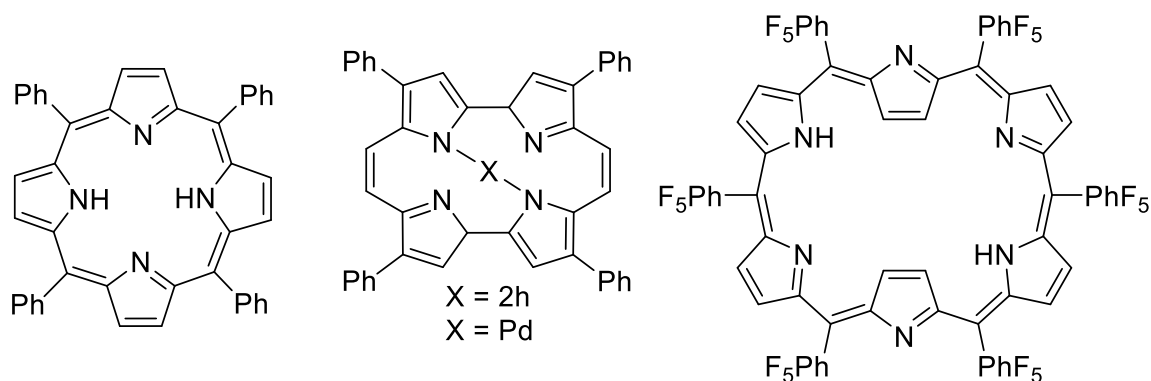


Figure 2- 11 : Tétra phényle porphyrines, porphycènes et porphyrines à cœur étendu.

composés	ϕ_{Δ}	σ_{TPA} (GM)	f (GM)
Porphycènes X = 2H	0,23	2280 à 770 nm	524,4
Porphycènes X = Pd	0,78	1750 à 770 nm	1365
Porphyrine	0,66	24 à 770 nm	15,84
Porphyrine étendue	-	9900 à 1200 nm	-

Tableau 2- 2 : Données spectroscopiques des molécules représentées Figure 2- 11.

I.5) Optimisation de la production d'oxygène singulet de molécules bi-photoniques

Une stratégie alternative dans l'élaboration de photosensibilisateurs à deux-photons consiste en « l'ajout » de groupements générateurs d'oxygène singulet à des chromophores optimisés pour l'ADP. C'est cette stratégie qui a été mise à profit dans le cadre de ce travail de thèse visant à établir les relations structure-propriétés au sein de cette famille de chromophores. Nous allons maintenant détailler les études d'ingénierie basées sur ce type de molécules.

I.5.a) Le cas des squarines

La génération d'oxygène singulet est expliquée par la présence de doublets non-liants dans les squarines. L'intérêt de ces molécules est de posséder de grandes sections efficaces. Pagani et al. ont décrit des squarines ayant des sections efficaces à deux photons supérieures à 10000 GM et produisant de l'oxygène singulet. Des rendements de génération d'oxygène jusqu'à 33% dans CS₂ ont été rapportés[216]. Webster et al. ont montré que le remplacement des oxygènes de l'oxocyclobutenolate par des atomes de soufre permet d'améliorer la production d'oxygène singulet jusqu'à 97% dans le toluène[217].

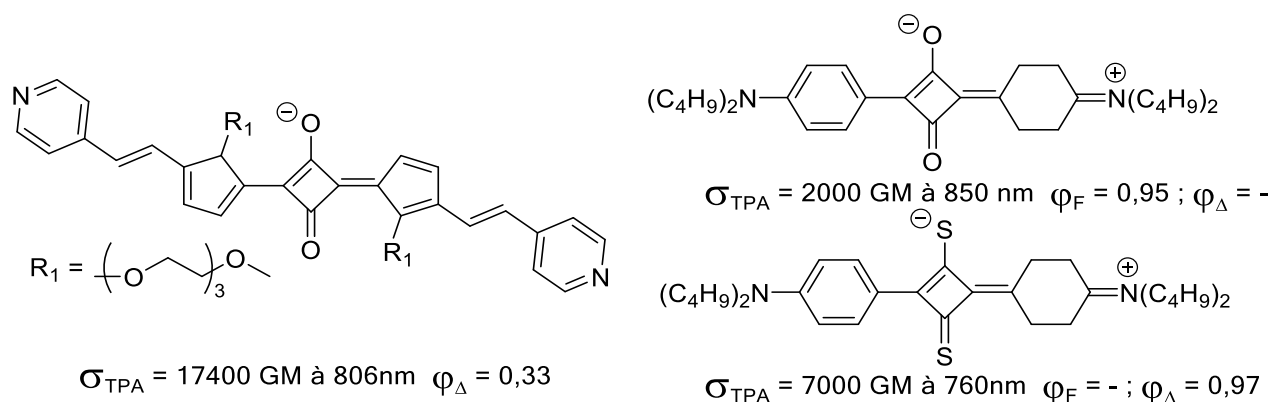


Figure 2- 12 : Exemple de squarines pour la PTD-TPA.

I.5.b) Effet d'atome lourd externe

Fantg et coll. ont développé des chromophores pour montrer l'influence du nombre de bromes portés par un substituant périphérique (non conjugué au cœur chromophore) sur la génération d'oxygène singulet du chromophore (Figure 2- 13). Pour chaque système, le passage de 1 à 5 ou de 2 à 10 bromes permet d'augmenter significativement la génération d'oxygène singulet. Cependant, cette augmentation s'accompagne d'une diminution de la valeur de la section efficace d'ADP. Cette diminution est attribuée à la réduction du caractère donneur de l'atome d'oxygène lorsque le nombre de bromes augmente à cause de l'effet inductif de ce dernier. Pour les composés e-f, le deuxième atome d'oxygène permet de maximiser la section d'ADP en augmentant le transfert de charge. Le nombre de brome module la génération d'oxygène singulet, le bénéfice apporté par l'augmentation du nombre d'atomes de brome résultant d'un effet d'atome lourd externe (c'est-à-dire généré par l'environnement du chromophore) étant beaucoup moins efficace que l'effet d'atome lourd interne (c'est-à-dire intrinsèque au chromophore).

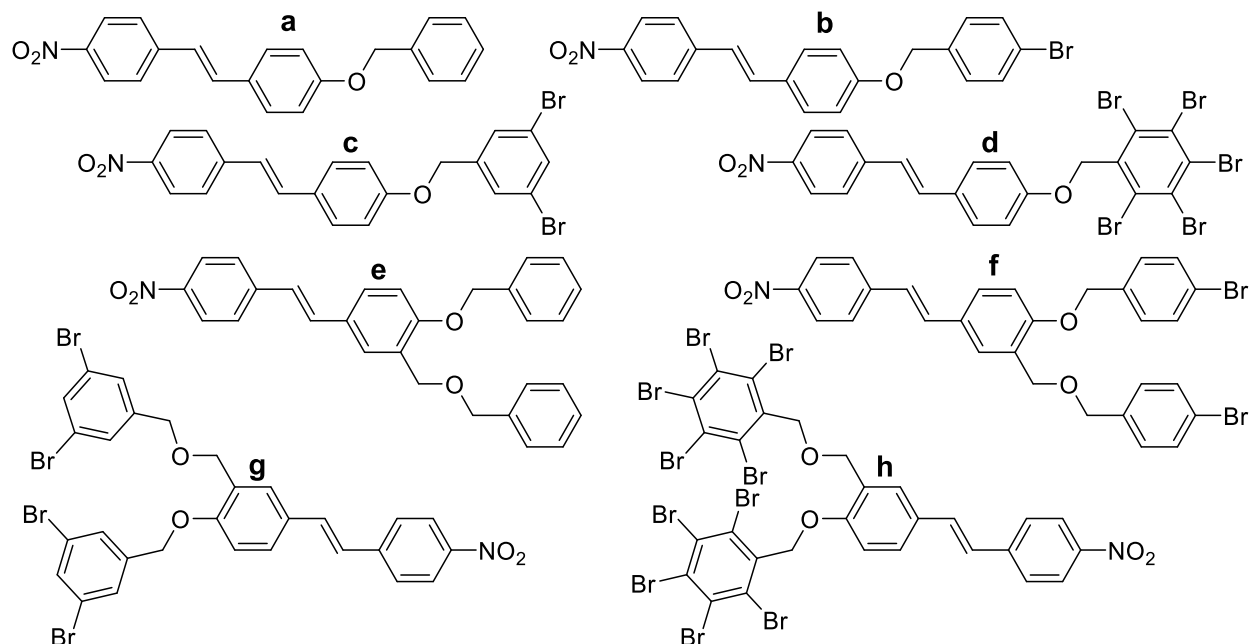


Figure 2- 13 : Variation du nombre de brome lié de manière non covalent à une molécule pour l'ADP.

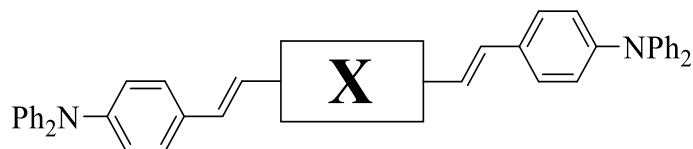
	solvant	a	b	c	d	e	f	g	h
φ_{Δ}	CH ₃ CN	0,634	0,635	0,656	0,715	0,715	0,731	0,768	0,871
$\sigma_{TPA}(\text{GM})^{\circ}$	THF	105	65	62	61	420	230	40	38
Nombre de brome		0	1	2	5	0	2	4	10

Tableau 2- 3 : Effet du nombre de brome sur la production d'oxygène singulet et évolution de la section efficace d'ADP.

I.5.c) Groupeur générateur et transfert de charge

Ogilby et coll. ont entrepris un travail d'ingénierie moléculaire sur la nature du groupement générateur d'oxygène singulet au sein d'une structure quadripolaire inchangée (Figure 2- 14)[218]. De tous les groupements étudiés, le groupement dibromo-phényle apparaît être le plus actif en PTD. Néanmoins, des groupements générateurs d'oxygène singulet moins performants comme le dicyano-phényle et bis(méthylsulfonato)-phényle permettent d'atteindre les plus fortes sections efficaces respectivement de 2815 et 4110 GM, en raison de leur caractère plus fortement électro attracteur influant favorablement sur le transfert de charge. Ce phénomène illustre l'influence des substituants centraux non seulement sur l'efficacité de génération d'oxygène singulet, mais également sur les propriétés relatives à l'ADP, et sur la nécessité d'établir un compromis entre l'efficacité de génération d'oxygène et le reste de ses propriétés spectroscopiques (section efficace d'ADP, rendement de fluorescence, position de la bande d'émission...). Les atomes de brome

apparaissent comme le bon compromis pour augmenter la figure de Mérite et seront retenus pour notre étude.



X	λ_{max}^{TPA} (nm)	σ_{max} (GM)	φ_f	φ_{Δ}	X	λ_{max}^{TPA} (nm)	σ_{max} (GM)	φ_f	φ_{Δ}
	845	1740	0,33	0,28		-	-	0,00	0,00
	770	1310	0,44	0,38		-	1150	0,9	0,08
	-	> 2280	0,4	0,15		-	1350	0,8	0,11
	775	1970	0,7	0,17		780	1970	0,8	0,09
	760	1460	0,8	0,09		845	2815	0,87	0,13
	760	1800	0,05	0,02		-	2030	0,8	0,08
	775	1040	0,1	0,04		765	1410	0,2	0,13
	-	4110	0,6	0,06					

Figure 2- 14 : Effet du groupement générateur d'oxygène singulet dans le toluène[218].

Ogilby a aussi travaillé sur les effets des liaisons doubles ou triples (Figure 2- 15). Il apparaît que la triple liaison permet de conserver la figure de mérite des composés, en plus de renforcer leurs photo-stabilité [219].

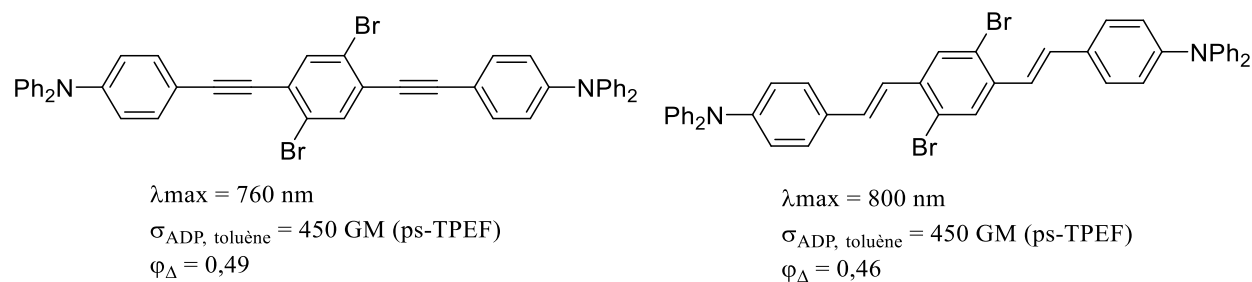


Figure 2- 15 : Influence de la liaison double et triple sur la génération d'oxygène singulet.

C. Tang et al. ont démontré sur une structure entièrement conjuguée d'indenofluorène que les atomes d'iode plus lourds permettent de maximiser la production d'oxygène singulet (Figure 2-16) [157]. A l'opposé le transfert de charge apparaît plus faible qu'avec les atomes de brome (les effets inductifs diminuent au sein d'une même colonne du tableau périodique). La section d'ADP se retrouve être alors légèrement plus faible.

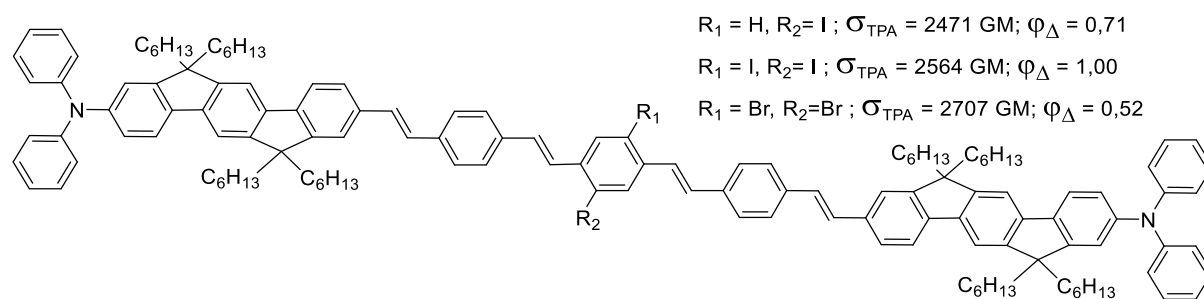


Figure 2- 16 : Comparaison des effets d'un atome diode ou de brome sur l'ADP et φ_{Δ} .

Cependant, la rationalisation des résultats de ces études, et la compréhension des mécanismes exacts occasionnant les variations observées dans l'efficacité de génération d'oxygène singulet restent délicates. En effet, les changements conséquents apportés aux structures dans ces études n'influent pas uniquement sur les constantes cinétiques de croisement inter-système, mais aussi sur l'ensemble des constantes cinétiques radiatives et non radiatives de l'état excité. Ceci se traduit notamment par des évolutions observées parfois erratiques et contradictoires de rendement *quantique de fluorescence et de génération d'oxygène singulet*. Il apparaît donc bénéfique de concevoir un travail d'ingénierie moléculaire permettant une étude spécifique et systématique des paramètres de substitution des photosensibilisateurs sur les cinétiques de croisement inter-système.

II Présentation du projet

Le projet de cette thèse s'inscrit dans ce cadre, et vise à l'optimisation de chromophores pour la photothérapie dynamique à deux photons en vue d'obtenir des figures de mérites $f(\varphi_{\Delta} \times \sigma_{ADP})$ importantes (Figure 2- 17). Le but plus spécifique de ce travail est d'étudier les relations entre la structure et l'activité de chromophores (ADP et génération d'oxygène singulet) et de remonter aux paramètres cinétiques d'évolution de l'état excité.

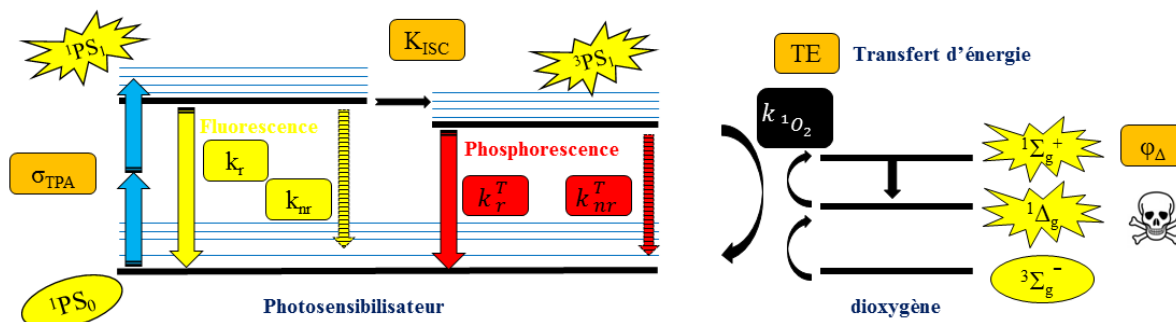


Figure 2- 17 : Paramètres cinétiques pour la PTD-ADP.

Nous souhaitons en effet, au travers de cette étude sur des composés quadripolaires à transfert de charge intramoléculaire (ICT), rationaliser l'influence des groupements générateurs d'oxygène sur les cinétiques de croisement intersystème afin d'établir un modèle d'ingénierie moléculaire généralisable à cette catégorie de chromophores. Nous avons mené cette étude selon la méthode décrite ci-après.

II.1) Choix de la méthode de travail

Le choix s'est porté sur une famille de chromophores possédant un squelette π conjugué identique. Le but de ce support, une structure carbonée commune à tous les chromophores, est que les modifications apportées par l'ajout/ le déplacement des groupements favorisant le croisement inter-système au sein de la structure entraînent le moins possible de répercussions sur les autres constantes cinétiques que sont les constantes de désexcitation radiatives et non radiatives des différents états excités de la molécule. L'efficacité de génération d'oxygène singulet ne dépend alors plus que de l'efficacité du croisement inter-système k_{CIS} . Cette dernière étant liée à la présence de groupement générateur d'oxygène singulet sur le chromophore, la relation entre structure

(nombre et position du groupement générateur, géométrie du système) et activité (génération d'oxygène singulet) peut alors être mise en évidence.

II.2) Le choix de la structure carbonée

L'originalité du projet réside donc dans une étude systématique se basant sur une structure fixe où seuls la position et/ou le nombre des groupements générateurs d'oxygène singulet sont modifiés. Le choix de cette plateforme est donc particulièrement important. Cette structure a été construite à la lumière des différents paramètres évoqués en introduction. La construction de cet édifice est basée sur la répétition d'un motif phénylène éthylnylène facilement accessible par réaction de Sonogashira avec un bon rendement[220] via un couplage pallado-catalysé [221]. Le groupe d'Ogilby a en effet montré par le passé que cette famille de chromophores présentait un potentiel intéressant pour des applications en PTD à deux photons, ce que des études au sein de notre laboratoire ont par la suite confirmé[222-224]. La répétition du motif conjugué permet d'obtenir une forte délocalisation du système π conjugué nécessaire à l'optimisation du transfert de charge, permettant d'obtenir de fortes sections efficaces d'absorption à deux photons. Corollairement, les groupements phényles terminaux doivent comporter des groupements donneurs forts, et nous avons pour cela choisi de travailler sur des dérivés de dihexylaniline. Cette substitution par des chaînes hexyles présente deux avantages. D'un point de vue électronique, elle renforce le caractère électro-donneur des anilines. La structure quadripolaire ainsi obtenue peut donner accès à de grandes sections efficaces. Par ailleurs, les chaînes hexyles permettent classiquement de limiter les phénomènes d'agrégation des composés π -étendus obtenus qui pourraient compliquer les études spectroscopiques. D'un point de vue pratique, la meilleure solubilité de ces composés facilite les étapes de traitement et de purification des différents intermédiaires et des produits finaux.

II.3) Le choix du groupement générateur d'oxygène singulet

La génération d'oxygène singulet est assurée par la substitution d'hydrogène d'un ou plusieurs des groupements phényle de la molécule par des atomes de brome en position 1,4. La présence de ces atomes lourds (brome) permet d'augmenter l'efficacité du croisement inter-système. En variant la position et/ ou le nombre de ces groupements 1,4-dibromophényles au sein de la structure et en observant l'effet de ces variations sur l'efficacité de génération d'oxygène singulet, il est en théorie

possible, d'après les arguments évoqués plus haut, d'établir un lien systématique entre les paramètres de substitution et la cinétique du croisement inter-système.

II.4) Nomenclature utilisée pour les chromophores

Afin de faciliter la lecture des résultats, nous avons choisi d'élaborer une nomenclature simplifiée pour la désignation des molécules dans cette étude. Ainsi, les phényles sont désignés par le chiffre zéro (0). Par défaut, les zéros terminaux correspondent aux groupes phényles porteurs des fonctions dihexyl-amine, groupement aniline. Le chiffre deux (2) (respectivement quatre (4)) représente un groupe 1,4-dibromophenyle (respectivement tétrabromophényle). L'écriture des liaisons alcynes est omise. Une liaison di-yne est symbolisée par tiret (-). Une liaison biphenyle est notée par un slash (/). Une nomenclature alternative est utilisée pour les composés octupolaires $O_i(\dots)_3$. Le O rappelle la géométrie octupolaire de la molécule et le groupe phényle central, le premier indice (i) correspond au nombre d'atomes de brome portés par ce groupe. Tous ces dérivés seront de symétrie D_{3h} ; de ce fait, i sera égal à 0 ou 3. Entre parenthèses se trouve la nature de la chaîne trois fois (deuxième indice) substituée au cœur central. La nomenclature de cette chaîne reprend les principes généraux explicités pour les molécules quadripolaires.

Ainsi, suivant cette nomenclature, la molécule initialement développée par le groupe d'Ogilby et servant de référence à cette étude sera notée **020** (Figure 2- 18). Les propriétés spectroscopiques de cette molécule dans le chloroforme, solvant utilisé dans notre étude, sont présentées dans le Tableau 2- 4. Cette molécule a ensuite été particulièrement étudiée dans le groupe par T. Gallavardin durant sa thèse, pour ses propriétés de PTD-ADP[65, 222, 225].

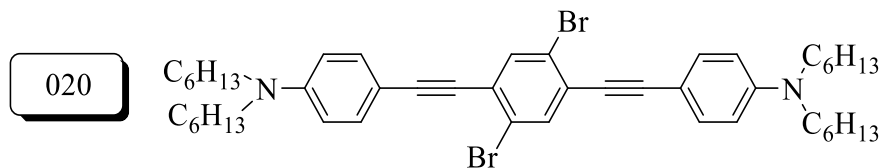


Figure 2- 18 Structure de la molécule 020.

Composé	λ_{abs} (nm)	ϵ (L.cm ⁻¹ .mol ⁻¹)	$\sigma_{ADP,max}(\lambda)$ (GM/(nm))	λ_{em} (nm)	ϕ_f	Déplacement de Stokes (cm ⁻¹)	ϕ_A	Temps de vie de fluorescence (ns)
020	421	91500	550 (730)	458	0.25	1919	0.53	0,26

Tableau 2- 4 : Données spectroscopiques de 020.

II.5) Etude antérieure à cette thèse

Les premières familles de chromophores ont été synthétisées par Pierre-Henri Lanoë et Thibault Gallavardin post-doctorants, et Chloé Armagnat, stagiaire de M1 au sein du groupe[159]. Une famille comportant cinq phényles, nommée ici pentamère, dont les composés **00000**, **02000**, **00200**, **02020** et **02220** font partie, a été synthétisée (Figure 2- 19). Les premiers résultats sur la famille des composés ont mis en évidence l'influence cruciale des paramètres de substitution des atomes de brome au sein de la structure sur les propriétés d'ADP et de génération d'oxygène singulet de ces chromophores. Les explications et les données spectroscopiques, remesurées avec précision et complétées dans le cadre de ce travail de thèse, seront discutées ultérieurement dans ce chapitre.

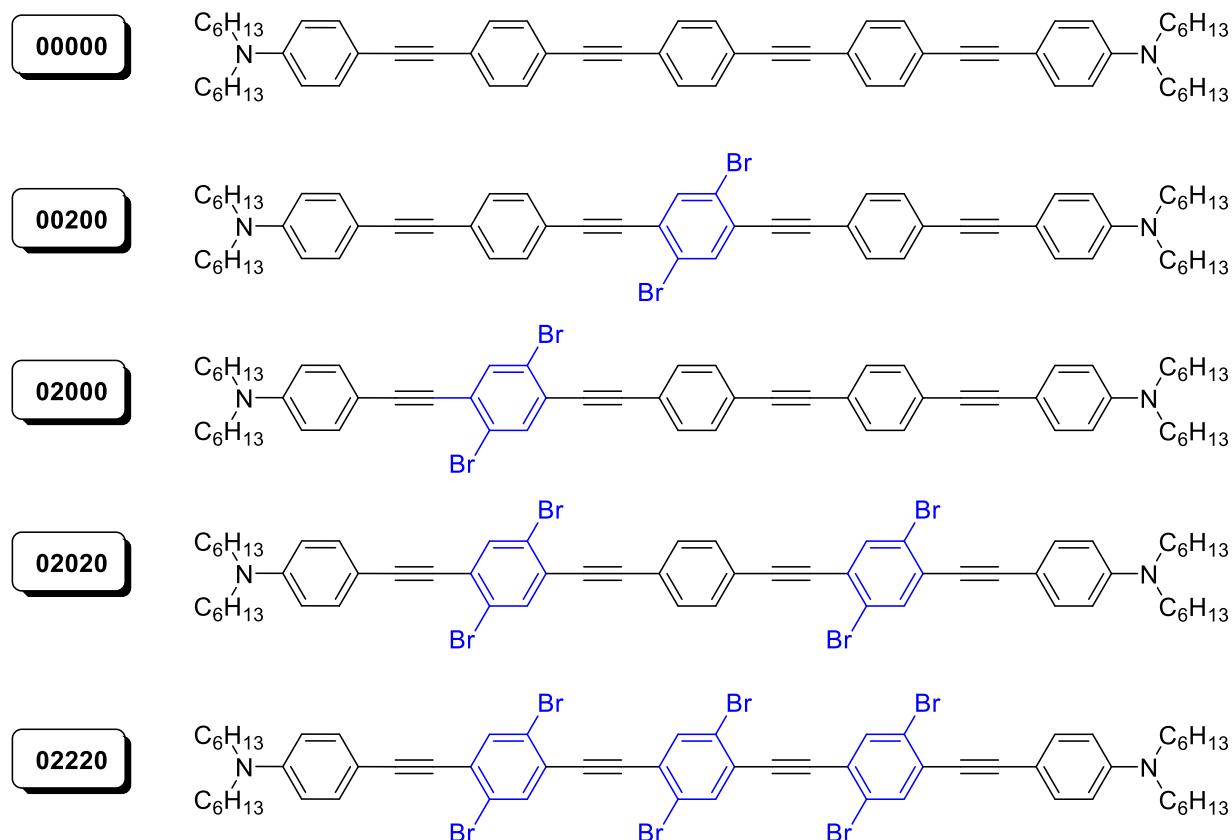


Figure 2- 19 : Famille des pentamères.

II.6) Les cibles du travail de thèse

Le but premier de ce chapitre de thèse a été de vérifier si les observations de cette première étude pouvaient être généralisées à une gamme plus étendue de chromophores absorbants à deux photons. L'objectif a donc été de poursuivre l'étude d'ingénierie moléculaire en modifiant de nouveaux paramètres, et d'étudier les conséquences de ces modifications sur les propriétés photophysiques des chromophores. La synthèse de chromophores répondant au même schéma général (répétition de motifs phénylèneéthynylène) a été entreprise, mais en modifiant systématiquement des paramètres structuraux importants.

Dans un premier temps, la structure carbonée a été limitée à quatre phényles. La famille possédant quatre phényles est désignée sous le terme tétramère. Le but est de faire le lien entre la famille à cinq phényles et la référence **020**. Au sein de ces tétramères, la nature du connecteur entre les deux phényles centraux a ensuite été étudiée. La liaison alcyne utilisée dans les précédentes familles a donc été successivement remplacée par un connecteur diyne, puis par une liaison directe de type biphényle. L'introduction de liaison diyne permet d'introduire à la fois une légère augmentation de la conjugaison du système et une possibilité de libre rotation partielle au sein de la molécule[65, 212, 213]. A l'inverse, une connexion directe de type biphényle permet d'imposer une torsion dièdre autour de la liaison centrale, par des effets de répulsion stérique. Dans les deux cas, les distorsions résultantes, qu'elles soient transitoires et liées à des possibilités de rotation (dienes) ou permanentes (biphenyles) peuvent conduire à un abaissement partiel de la symétrie ($D_{4h} \rightarrow D_{2d}$). Il nous paraissait intéressant d'étudier l'effet de cet abaissement sur la photophysique du système. Les cibles tétramères sont présentées Figure 2- 20.

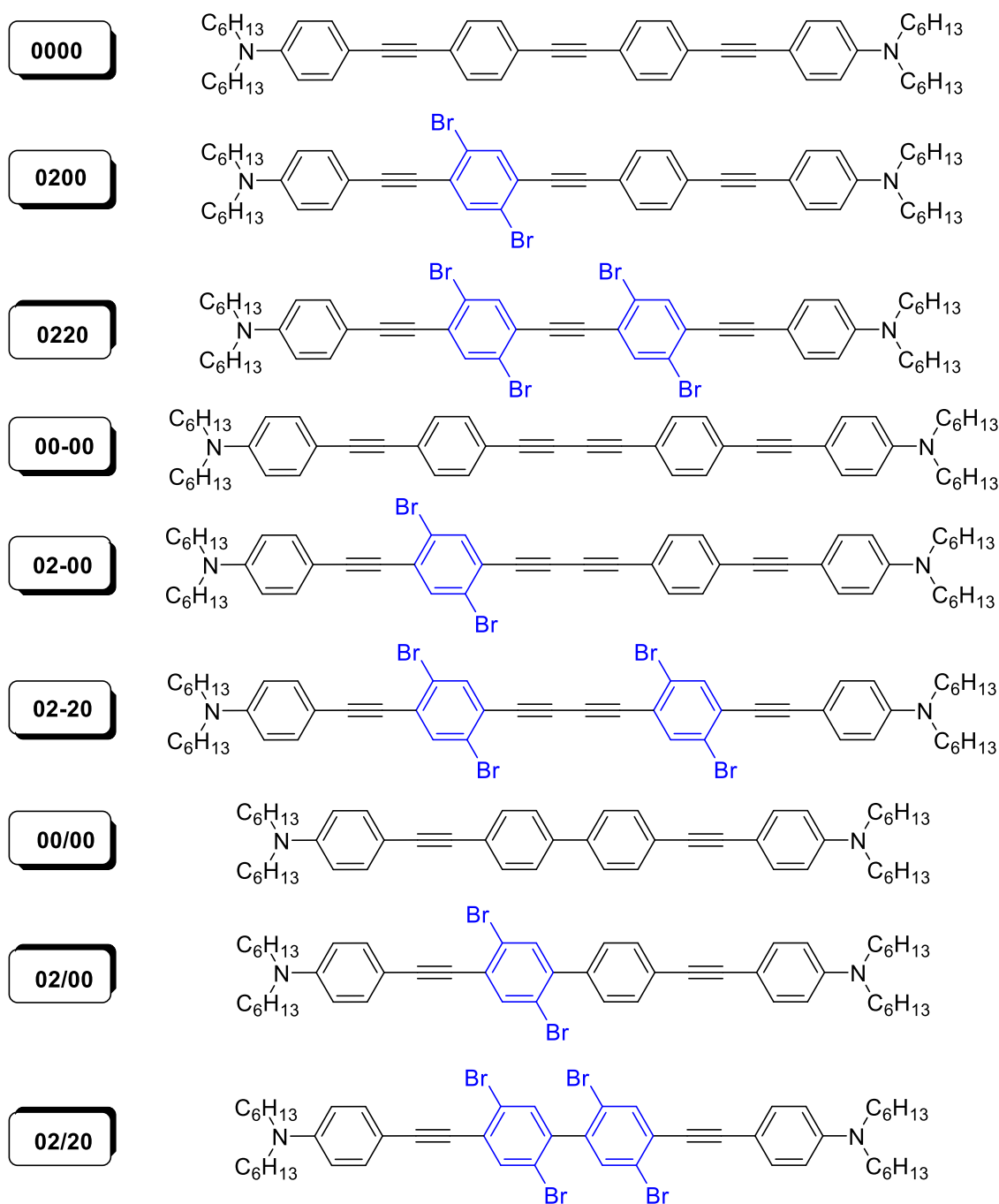


Figure 2- 20 : Représentation des tétramères cibles.

Dans une logique similaire visant à une meilleure compréhension de l'influence de la symétrie sur ces mêmes propriétés, la synthèse de composés octupolaires (D_{3h}) a été entreprise. Dans cette famille, deux paramètres ont été étudiés : l'influence de la longueur de conjugaison et l'influence du nombre/position des atomes de bromes. Les composés de symétrie octupolaire ciblés sont présentés Figure 2- 21.

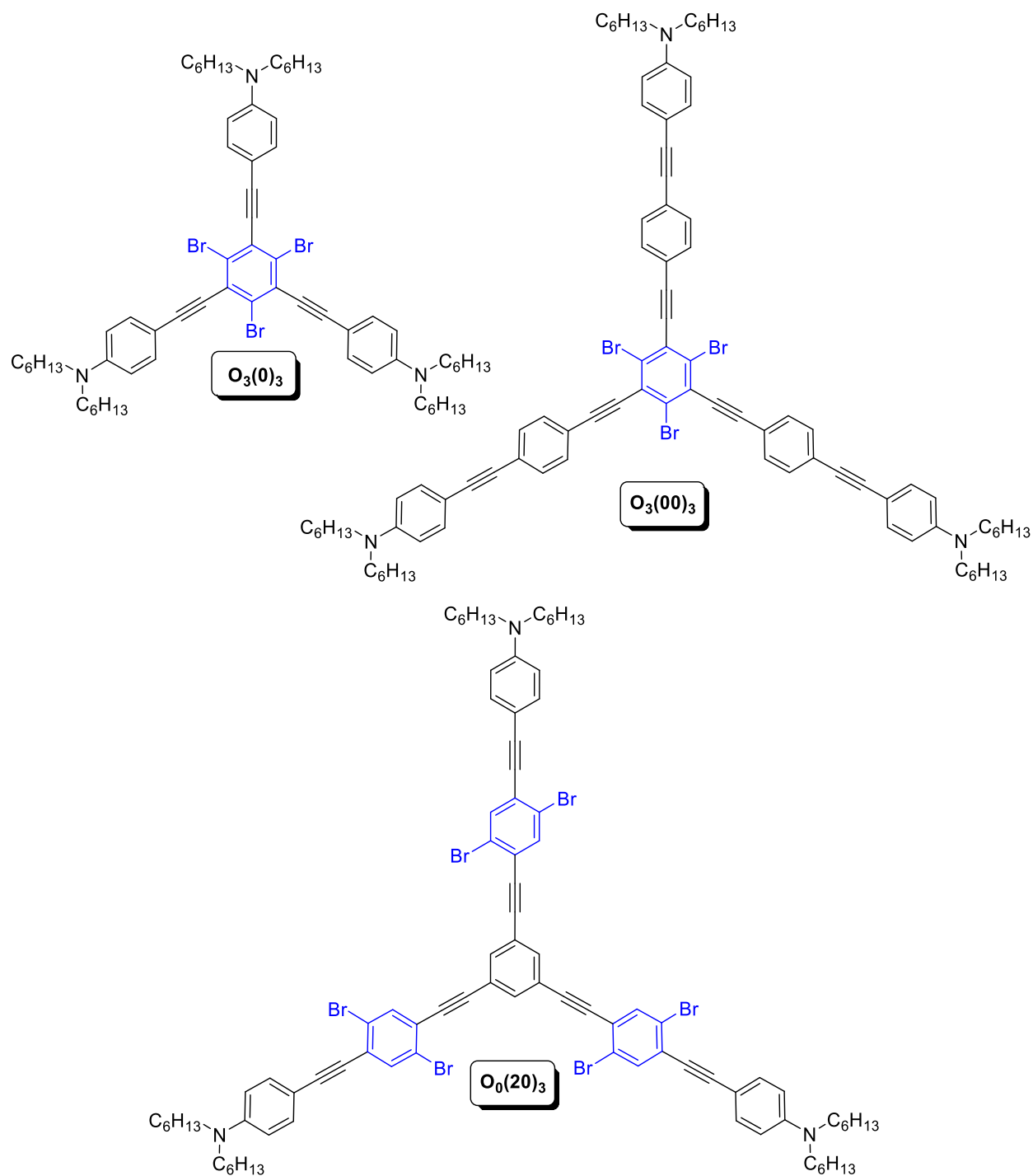


Figure 2- 21 : Structure de molécules octupolaires ciblées.

En plus de ces variations, nous avons choisi d'étudier d'autres paramètres de substitution de ces chromophores. La synthèse du chromophore **040** a été entreprise dans le but de quantifier l'effet d'une augmentation de la substitution en atomes lourds sur un phényle unique. La synthèse d'un régiosomère, toujours tétrasubstitué par des bromes, mais cette fois-ci portés sur les fonctions

aniline (**202**) nous a enfin permis de nous intéresser à la substitution de ces dernières, non étudiée jusqu'ici. Enfin, le travail réalisé dans le cadre de cette synthèse a permis de mettre au point une nouvelle méthode de désymétrisation sur le cœur 1,4-dibromobenzène, permettant l'accès au dernier chromophore de la famille des pentamères (**02200**), non entreprise auparavant. Ces nouvelles cibles sont représentées Figure 2- 22.

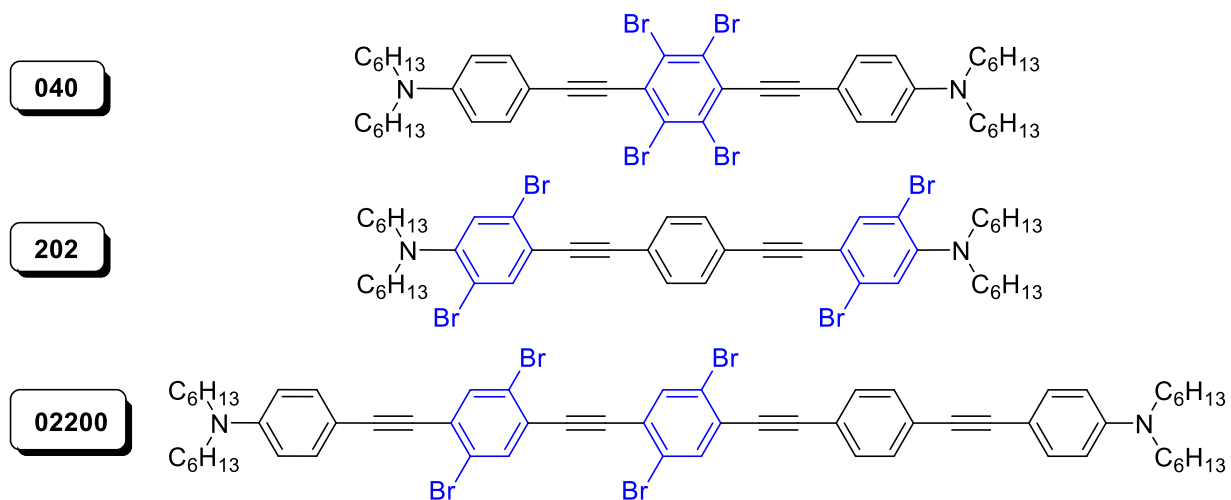


Figure 2- 22 : Cibles 040, 202 et 02200.

La synthèse de l'ensemble de ces cibles va maintenant être décrite.

III Synthèse des chromophores

III.1) Synthèse des composés pentamères et tétramères à pont central alcyne

La synthèse des pentamères et à tétramères est basée sur l'utilisation de fragments communs. La réaction de Sonogashira est utilisée notamment parce qu'elle permet de différencier la réactivité des atomes d'iode et de brome en jouant sur un seul facteur, la température. Ainsi un iodo-phényle peut être engagé dans des réactions de Sonogashira à température ambiante alors que pour un bromo-phényle une température supérieure à 80°C est requise. Les conditions expérimentales qui seront utilisées par défaut pour ce couplage organométallique sont : solvant THF/Et₃N (1/1 vol/vol), système catalytique PdCl₂(PPh₃)₂/CuI[226]. Le principal problème de ces synthèses est la réaction de désymétrisation du cœur di-bromophényle, réaction essentiellement statistique dont les rendements oscillent entre 20-40% selon les conditions expérimentales[225, 227]. Le diodo-

dibromo-benzène est obtenu par iodation dans l'acide sulfurique du p-dibromobenzène commercial. Les groupements dihexylanilines terminaux sont synthétisés à partir de la iodo-aniline via une di-alkylation suivie d'un couplage de Sonogashira avec un acétylène protégé (Figure 2-23).

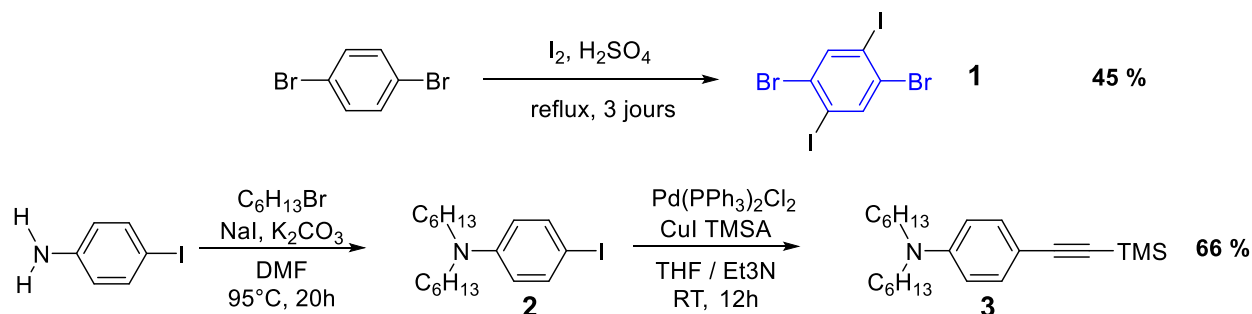


Figure 2- 23 : Synthèse des précurseurs à partir des composés commerciaux.

Pour la famille des pentamères, une suite de réactions de Sonogashira permettant d'introduire les groupes phényles ou les liaisons alcynes et de déprotection du groupement trialkylsilyle permet d'obtenir les dérivés **00000**, **00200**, **02020** et **02220**. Leur synthèse est décrite Figure 2- 24. La synthèse des composés dissymétriques sera décrite par la suite. Pour la famille à quatre phényle avec un pont central alcyne, les mêmes fragments que ceux décrits Figure 2- 24 peuvent être utilisés comme intermédiaires. La synthèse des composés **0000**, **0200** et **0220** est présentée Figure 2- 25. La difficulté majeure de ces réactions de couplage est l'inévitable formation de produits issus des réactions d'homocouplage et possédant des solubilités et des temps de rétention sur colonne de silice voisins des composés cibles, ce qui rend les purifications de ces derniers délicates.

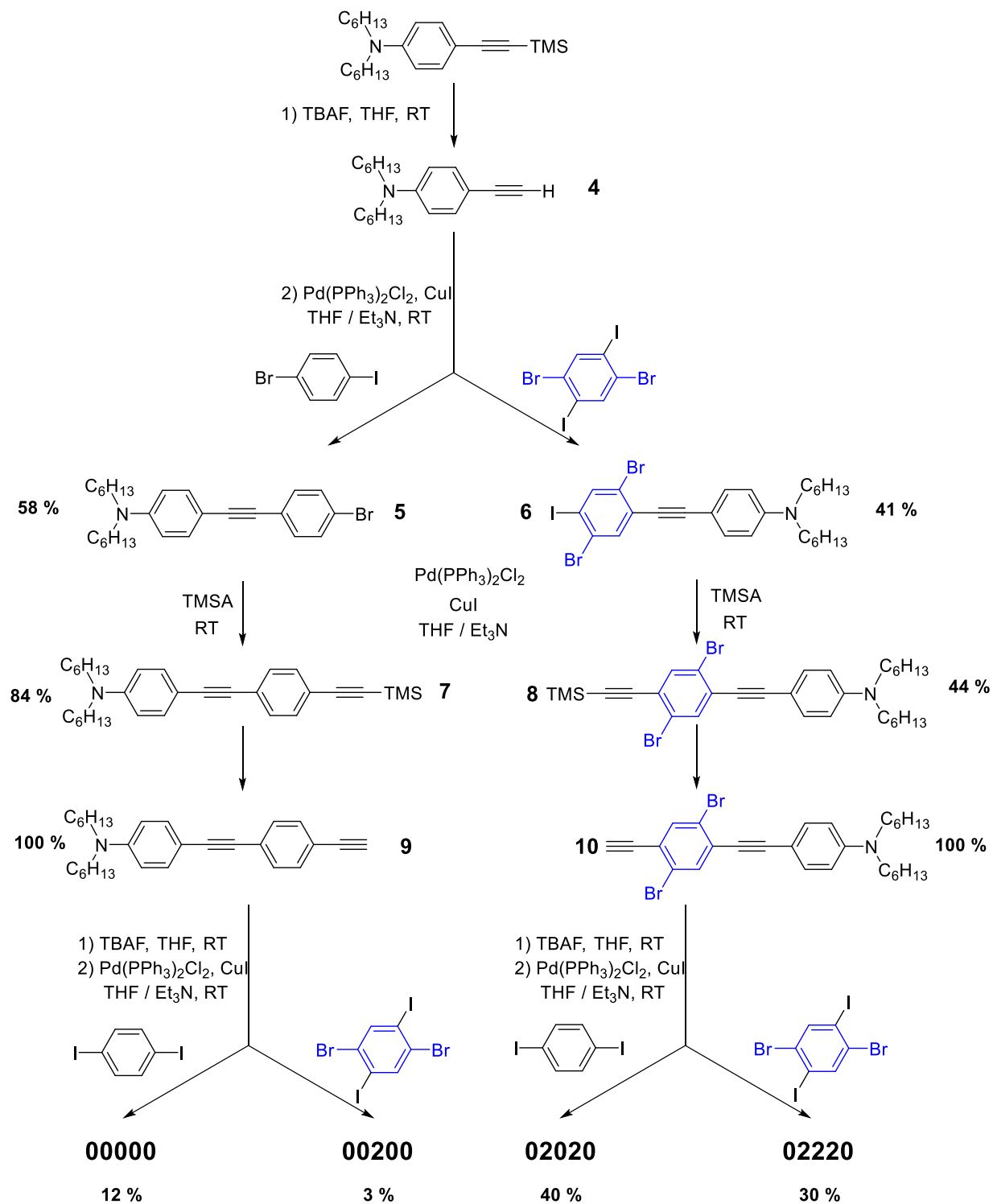


Figure 2- 24 : Synthèse des composés symétriques de la famille à cinq phényles.

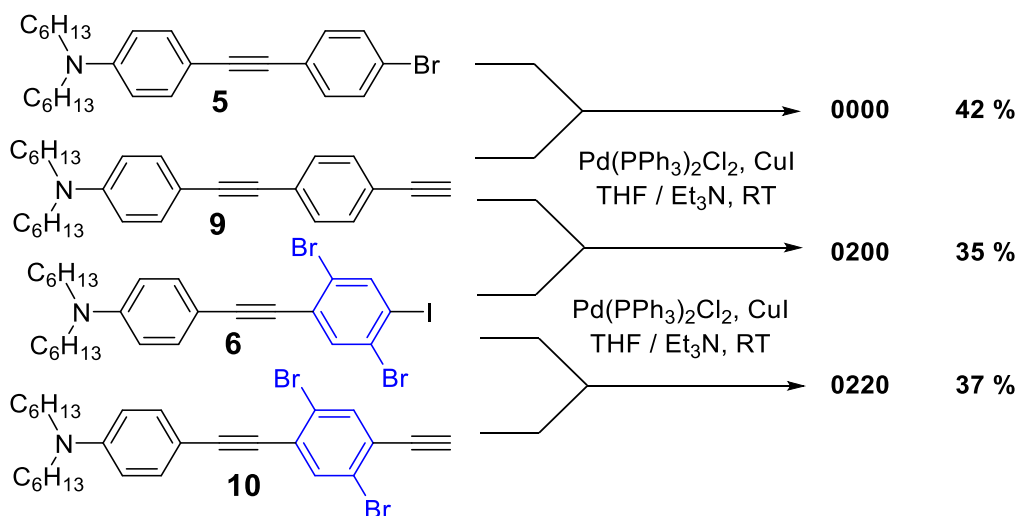


Figure 2- 25 : Dernier couplage de Sonogashira permettant l'accès à la famille quatre phényles espaceur central alcyne.

III.2) Formation d'un pont diyne

La synthèse des cibles avec un espaceur central diyne peut être envisagée par différentes stratégies[228]. Celle retenue consiste en un homocouplage oxydatif de Gläser en présence de cuivre au degré d'oxydation +I, d'air dont l'oxygène joue le rôle d'oxydant et de triéthylamine comme base. Ce type de réaction permet d'obtenir avec de bons rendements les composés diynes symétriques. Cette stratégie s'avère cependant inefficace dans le cas du diyne dissymétrique **02-00**, permettant au mieux de générer un mélange statistique des trois diyne **00-00**, **02-00**, **02-20**. Afin de permettre à la désymétrisation d'opérer avec de bons rendements, on substitue au préalable le proton acide de l'alcyne par un atome d'iode, via un intermédiaire lithié de l'alcyne[229] (Figure 2- 26).

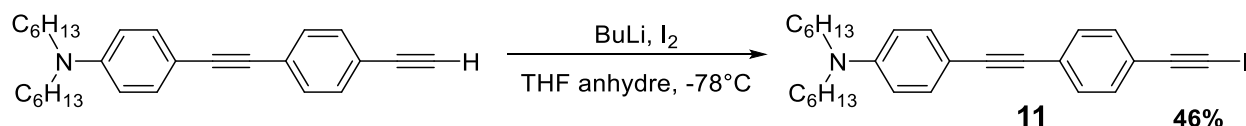


Figure 2- 26 : Introduction d'un atome de d'iode sur une fonction alcyne.

A partir de l'ensemble des précurseurs, **9**, **10** et **11**, on obtient les composés **00-00**, **02-00** et **02-20**. La Figure 2- 27 rend compte du couplage de Glaser terminal. Les rendements sont très bons pour les couplages symétriques. En revanche, dans le cas du composé **02-00**, la stratégie développée n'a pas permis d'améliorer le rendement, qui reste limité à 22%. Cependant, l'élimination complète du composé **02-20** du mélange statistique permet de faciliter la purification, et d'obtenir le composé cible **02-00** sans purification difficile.

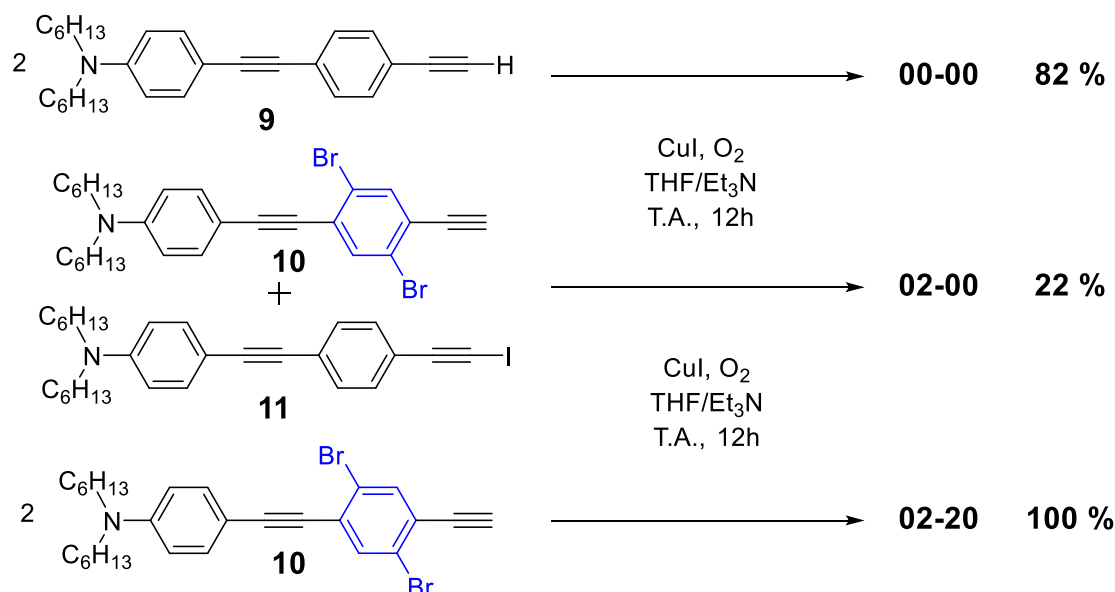


Figure 2- 27 : Synthèse des composés de la famille des quatre phényles avec un bras espaceur de type diyne.

III.3) Synthèse des cœurs tétrabromés et tribromés

La synthèse de ces deux familles nécessite l'obtention de cycles aromatiques perhalogénés, composés dont la synthèse requiert des conditions extrêmement dures en raison du fort appauvrissement électronique du cycle résultant des halogénations successives[230, 231]. La synthèse du 1,2,4,5-tétabromo 3,6-diiodobenzène est ainsi menée en milieu acide sulfurique concentré en présence de diode et d'iodate de potassium (Figure 2- 28). Après neutralisation du milieu et réduction du diode excédentaire, le composé cible est obtenu avec un bon rendement. La neutralisation est une étape importante du traitement : la réduction du diode sans traitement basique préalable a pour conséquence la génération de soufre colloïdal qui est un poison puissant pour les catalyseurs à base de palladium utilisés dans les étapes de couplage suivantes.

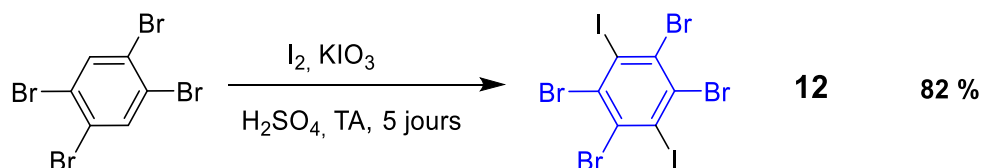


Figure 2- 28 : Iodation du tétrabromobenzène.

Pour les composés octupolaires, de symétrie D_{3h} , leur synthèse a d'abord consisté à synthétiser les cœurs des octupôles à partir du 1,3,5-tribromobenzène commercial (Figure 2- 29). La substitution des atomes de brome en iode a été testée pour permettre des couplages de Sonogashira plus efficaces[232]. Malheureusement, les caractérisations (RMN, T_f) du produit obtenu n'ont pas

permis d'être sûr de la pureté. La triiododation du tribromobenzène est réalisée avec un rendement de 74% en présence d'iodure de potassium et d'acide per-iodique en milieu acide sulfurique concentré[233, 234].

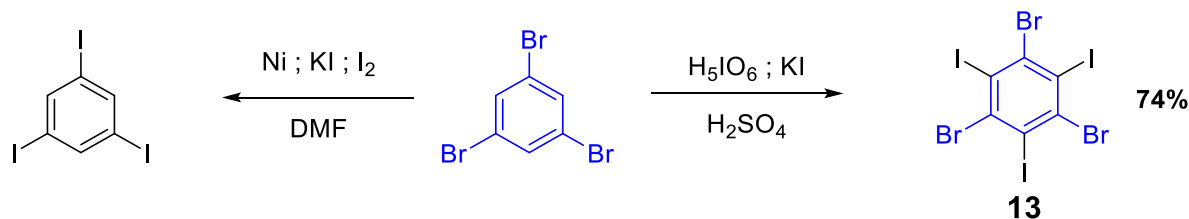


Figure 2- 29 : Synthèse des cœurs des octupôles.

Différents essais de couplage de Sonogashira entre le tétrabromodiiodobenzène et le p-alcynedihexyl-aniline (**4**) ont été effectués dans des conditions classiques (température ambiante ou faible chauffage), sans qu'une réaction quelconque soit observée sur les positions halogénées. L'encombrement stérique autour des centres réactifs du noyau aromatique est certainement le facteur qui influe défavorablement sur la barrière énergétique de cette réaction. Afin de remédier à cette absence de réactivité, nous nous sommes inspirés d'exemples rapportés dans la littérature portant sur des réactions de couplage de Sonogashira sur des dérivés aromatiques perhalogénés[233, 234]. Il apparaît que pour ce type de composé un chauffage à une température supérieure à 80°C est nécessaire à la réaction, qui reste sélective de l'iode quelque soient la nature de l'alcyne et du catalyseur employés (Figure 2- 30).

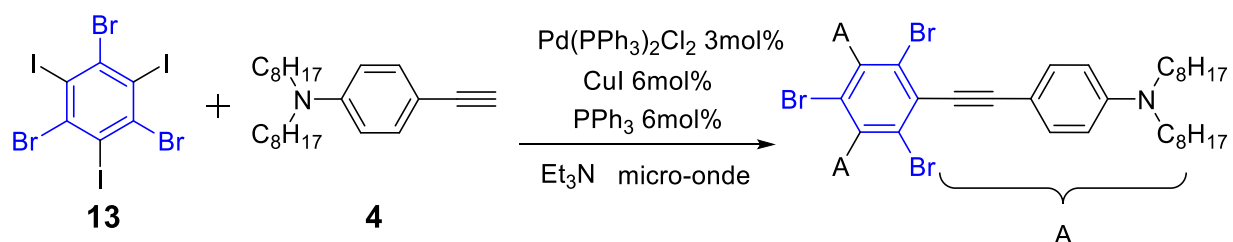


Figure 2- 30 : Conditions d'obtention d'un octupôle encombré.

Conditions		Produit (pourcentage)		
Equivalents alcynes	Chauffage	bis-substitué	Tri-substitué	Tétra-substitué
4,0	24h, reflux	10	21	20
2,5 / 1,4	14h reflux / 24h 55°C	32	17	32

Tableau 2- 5 : Rendement de la synthèse en fonction des conditions expérimentales.

Dans notre cas, l'utilisation d'un chauffage par micro-onde en tube scellé pendant 46 h à 80°C a permis d'obtenir le dérivé **040** avec un rendement de 35% (Figure 2- 31). Le produit n'est obtenu qu'à l'état de trace avec un chauffage à reflux classique. Le produit de mono-addition n'a pas pu

être isolé. Les tentatives de couplage, dans des conditions identiques, avec l'alcyne **9**, ne mènent à aucun produit d'intérêt.

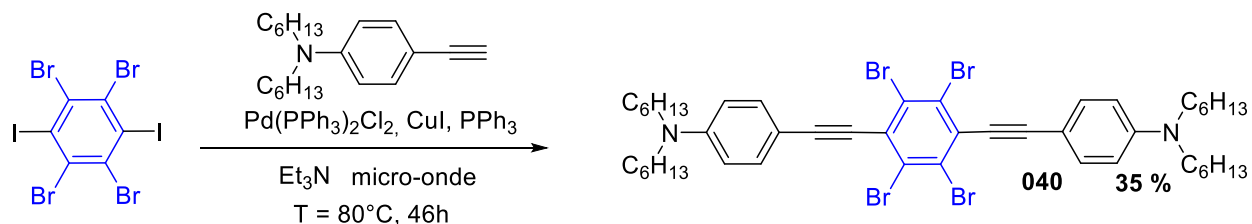


Figure 2- 31 : Synthèse du composé **040**.

Le premier octupôle est obtenu en utilisant les mêmes conditions opératoires que celles utilisées pour l'obtention de **040**, en faisant réagir **12** avec l'aniline **11** avec un rendement de 34% (Figure 2- 32).

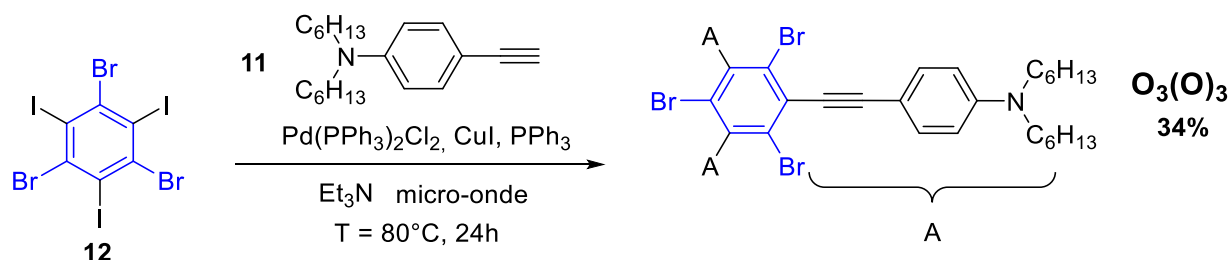


Figure 2- 32 : Synthèse de l'octupôle **O₃(O)₃**.

Pour les deux autres octupôles cibles (**O₃(00)₃** et **O₀(20)₃**) possédant des bras ayant une conjugaison plus étendue, l'utilisation de conditions identiques conduit à l'obtention quasi-exclusive des produits d'homocouplage des anilines (Figure 2- 33).

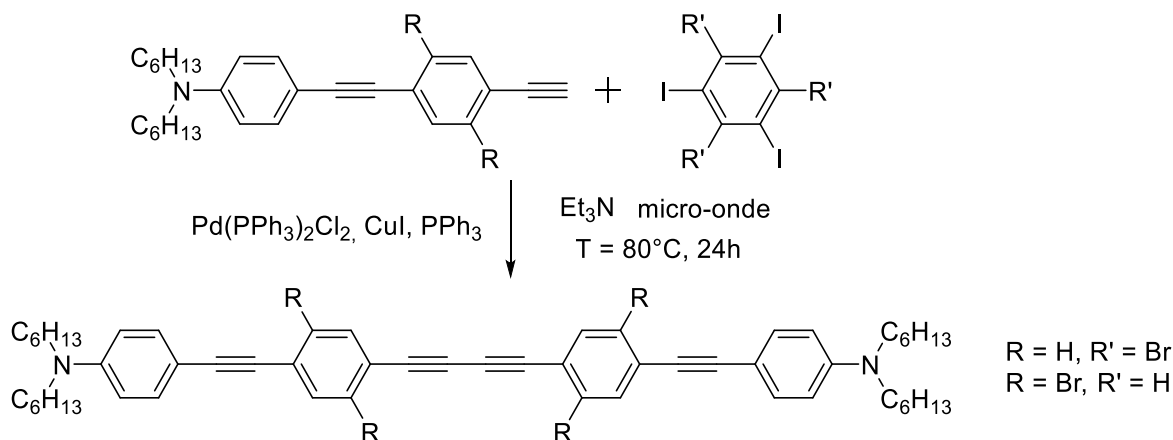


Figure 2- 33 : Produit d'homocouplage obtenu.

Afin de contourner cette dernière étape, on fait tout d'abord réagir le tribromo-triodobenzène d'une part, le tribromobenzène d'autre part avec TMSA. Avant de mener le couplage de Sonogashira, les groupements silylés sont déprotégés en présence de carbonate de potassium (Figure 2- 34).

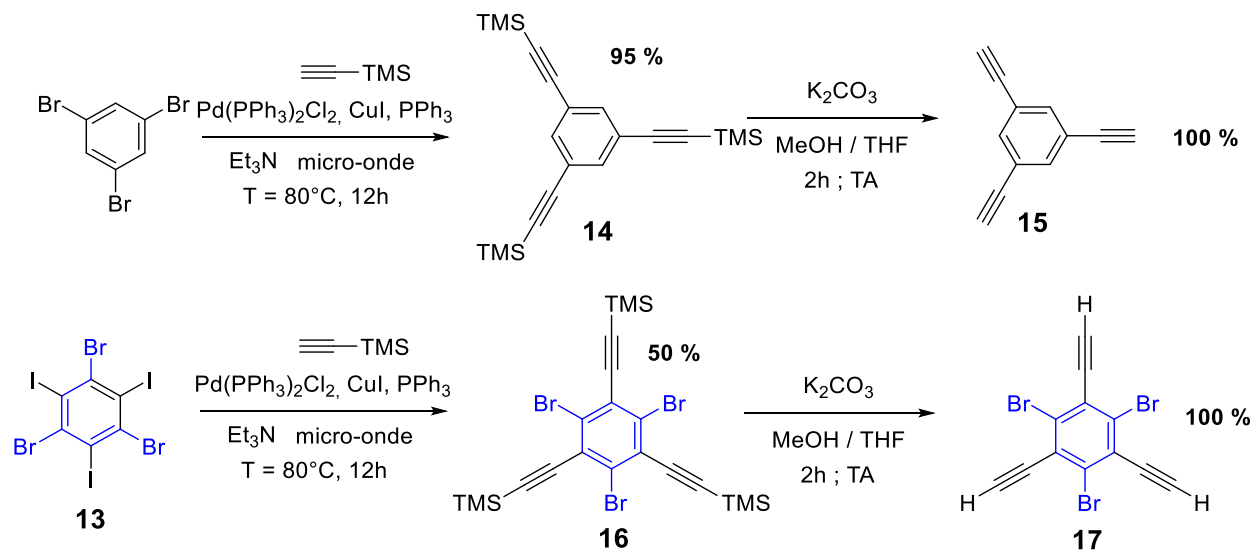


Figure 2- 34 : Synthèse des cœurs octupôles portant la fonction alcynes.

Les cœurs porteurs des trois fonctions alcynes sont alors utilisés dans des réactions de Sonogashira avec le dérivé iodé adéquat, permettant d'obtenir avec des rendements modestes les octupôles $\text{O}_3(00)_3$ et $\text{O}_0(20)_3$. (Figure 2- 35).

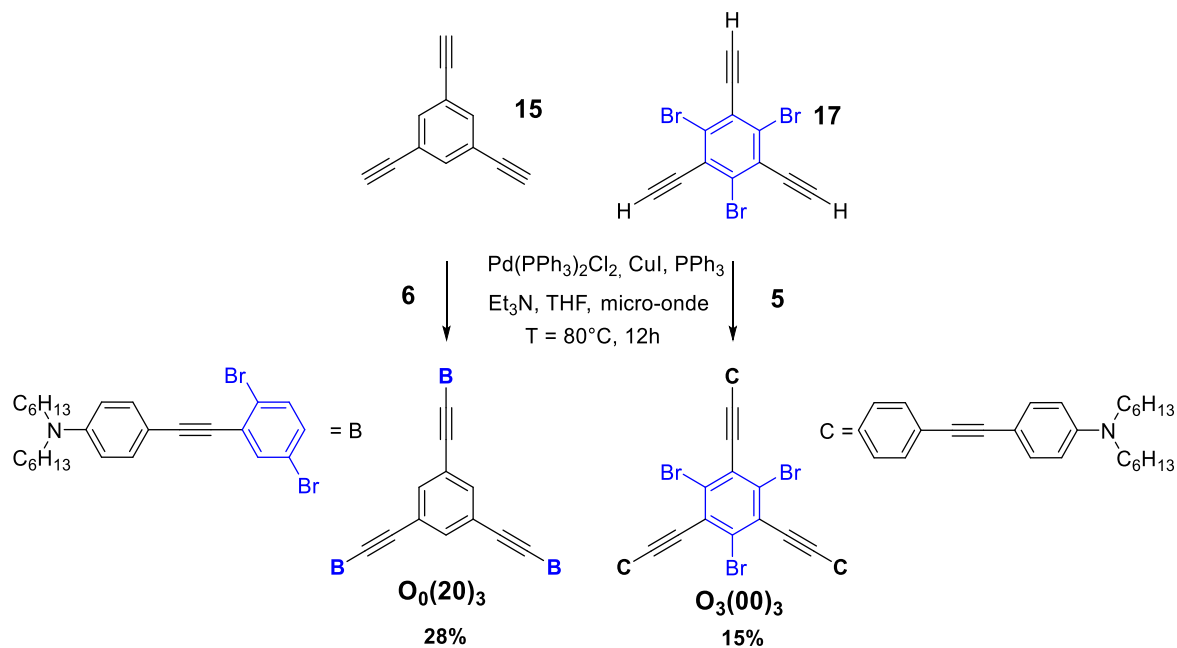


Figure 2- 35 : Dernière étape de synthèse des octupôles $\text{O}_3(00)_3$ et $\text{O}_0(20)_3$.

III.4) Synthèse des anilines bromées

La première voie de synthèse explorée consiste successivement à bis N-alkyler la 2,5 dibromoaniline puis à réaliser son iodation en para (Figure 2- 36). L'utilisation d'une base comme

K_2CO_3 , condition classique, n'est pas suffisante pour réaliser la bis-alkylation et seul le produit mono-alkylé est obtenu. Par traitement avec NaH en présence d'éther couronne 15-O-5 dans le THF anhydre, la di-alkylation par le bromo-hexane est réalisée avec un rendement de 60% (35% de mono-hexyl)[235]. La iodation classique des anilines par le diode dans THF/Pyridine ou THF/dioxane a été testée sans succès[236]. Les produits obtenus étant majoritairement (et de manière assez surprenante) poly-iodés. Une méthode originale proposée par Vollhardt *et coll.* utilisant le NIS dans le DMSO a alors été testée[237]. Dans la publication originale, cette méthode est utilisée pour la synthèse de la 2,5-dibromo,4-iodoaniline à partir de la dibromoaniline, avec un rendement supérieure à 90% et en limitant la formation des différents régioisomères de position (régiosélectivité en para). Cette méthode appliquée aux produits di-hexylés donne effectivement accès uniquement au produit iodé en para. Cependant, de manière encore une fois surprenante, une mono-déshexylation est observée.

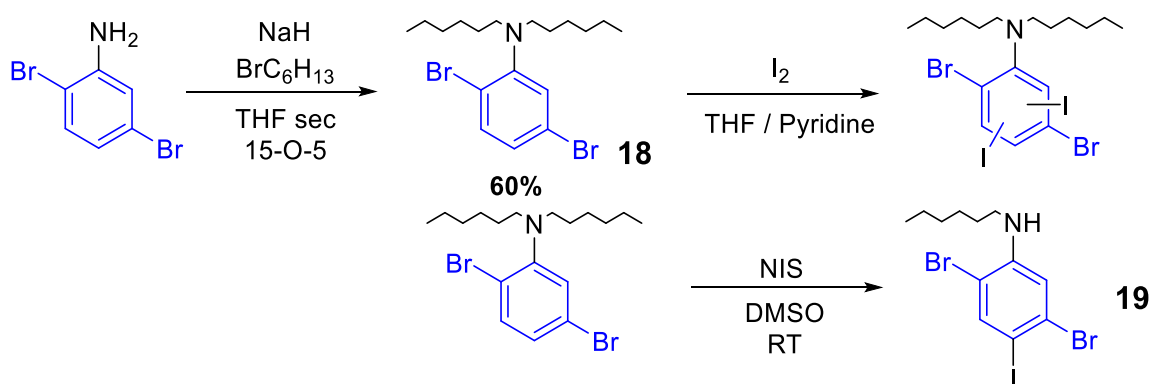


Figure 2- 36 : Réaction non sélective de la iodation de la dihexyle aniline.

Afin de résoudre cette difficulté, une stratégie de synthèse inverse a été testée (Figure 2- 37). Dans ces conditions, l'étape de iodation de la dibromoaniline est très efficace et le rendement est conforme à celui observé dans la littérature (98%). La 2,5-dibromo-4-iodoaniline est ensuite alkylée en utilisant les conditions décrites dans le paragraphe précédent. L'utilisation de ces conditions expérimentales mène aux produits dihexylés, mais on observe également la substitution totale de l'atome d'iode en para par un hydrure. Cette substitution nucléophile aromatique très inattendue est observée majoritairement même lorsqu'on travaille en défaut de NaH (<2éq).

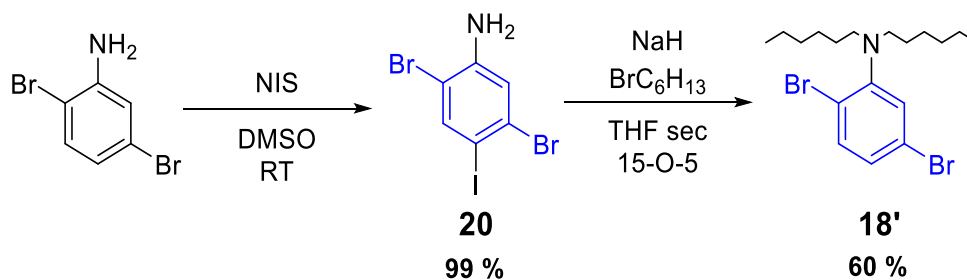


Figure 2- 37 : Seconde stratégie pour obtenir la 2,5dibromo-4iodo-aniline.

Pour éviter cette réactivité, le composé est impliqué dans un couplage de Sonogashira avec le triisopropyle silyle acétylène avant la réaction d'alkylation. Ce couplage de Sonogashira s'effectue avec un excellent rendement. La bisalkylation est alors menée dans les conditions décrites ci-avant et donne accès au produit cible, avec l'alcyne partiellement déprotégé, mais également à une faible proportion de produit monoalkylé, éliminé au cours de la purification (Figure 2- 38). Le dernier couplage de Sonogashira est alors réalisé sur le di-iodophényle pour obtenir le composé cible **202**.

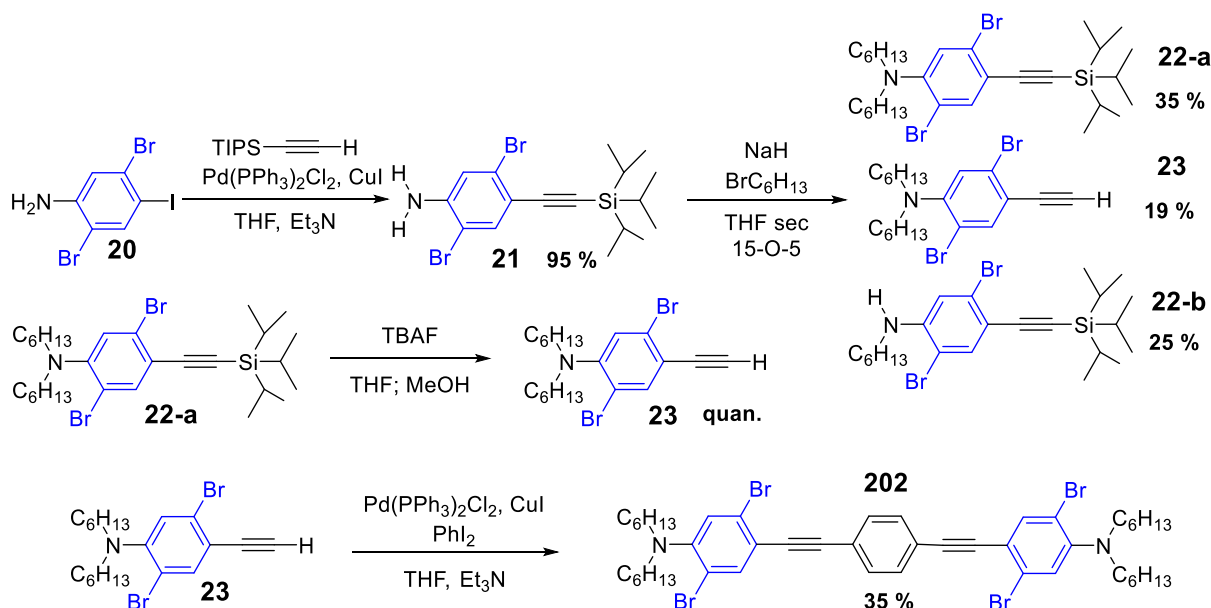


Figure 2- 38 : Synthèse de l'obtention du composé 202.

Un des intermédiaires réactionnels issu de la synthèse de **202** peut être mis à contribution dans une nouvelle voie de synthèse permettant la dé-symétrisation du cœur dibromophényle (Figure 2- 39). En effet, la fonction aniline de l'intermédiaire **21** peut être convertie en iode, dans une réaction analogue à celle de Sandmeyer, en milieu acide et par action successive de nitrite de sodium et d'iodure de potassium[238, 239]. Cette technique permet de s'affranchir des réactions de désymétrisation complexes décrites auparavant (Figure 2- 24) et par là même d'améliorer le rendement général des synthèses. Cette optimisation a permis d'envisager la synthèse du dernier

composé de la famille pentamère, le **02200**, et d'obtenir le composé **02000** avec un meilleur rendement, et de compléter les études spectroscopiques et photophysiques.

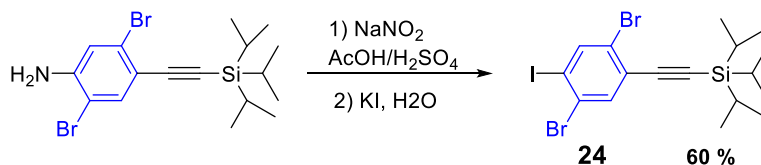


Figure 2- 39 : Désymétrisation du cœur dibromobenzène.

III.5) Synthèse des pentamères dissymétriques

Les composés **02000** et **02200** ont été synthétisés suivant la séquence décrite Figure 2- 40, consistant en une série de couplages de Sonogashira et de déprotections de groupement silyle.

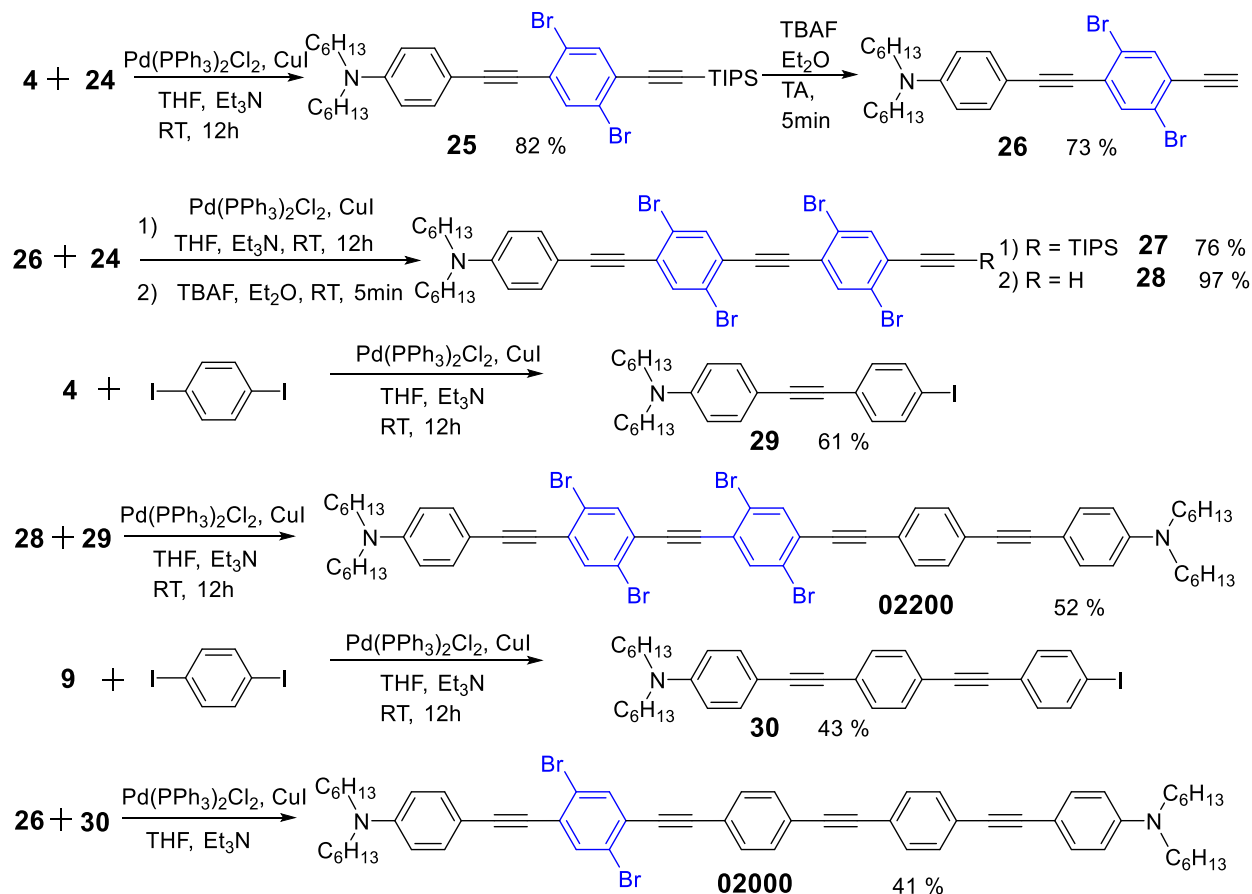


Figure 2- 40 : Méthodologie de synthèse à partir de 24.

III.6) Synthèse de la famille tétramère à pont central bi-phényle.

L'étape clé de cette synthèse consiste en une réaction de Suzuki entre un ester boronique et un dérivé phényle iodé de deux (p-phényléthylène)anilines. Les intermédiaires obtenus dans la synthèse des quatre phényles rendent ces produits accessibles. Des conditions usuelles, reportées dans le Tableau 2- 6, ont été testées pour la synthèse des dérivés d'ester boronique issu de **5** et **29** (Figure 2- 41)[240]. L'utilisation d'organométalliques d'alkalins ou d'alkalino-terreux ne permet pas la formation des esters boroniques souhaités. Les produits isolés sont cohérents avec des réactions d'élimination des atomes d'halogènes. Avec le $\text{Pd(PPh}_3)_4$, les bromes, par leurs encombrements et leur caractère accepteur, empêchent toute réaction.

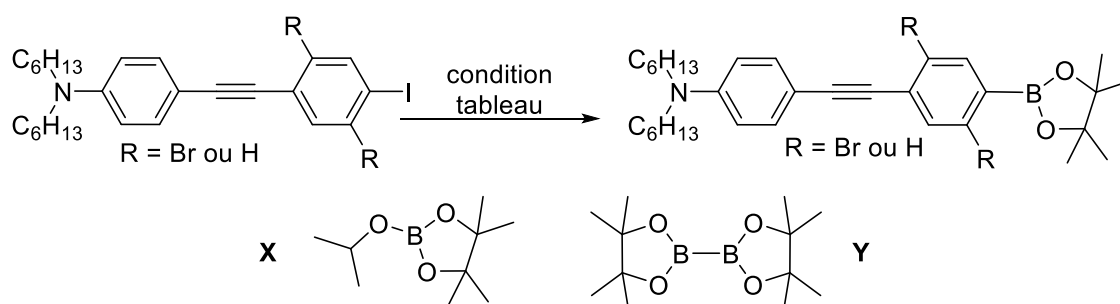


Figure 2- 41 : Synthèse des esters boroniques à partir des dérivés iodés à disposition (**5** et **29**).

Réactif	Condition opératoire	rendement
6	1) 1,1 éq iPrMgBr, THF	traces
29	2) X , THF	traces
6	1) 1,1 éq nBuLi, THF	traces
29	2) X , THF	traces
6	1) 0,9 éq nBuLi, THF	traces
29	2) X , THF	traces
6	$\text{Pd(PPh}_3)_4$	traces
29	Y	20%

Tableau 2- 6 : Conditions expérimentales pour l'obtention des ester boroniques issus de **5** et **29**.

Ces difficultés nous ont amenés à revoir la méthode de synthèse. L'ester boronique **31** a été obtenu par réaction de Sonogashira entre la 4-éthynyldihexylaniline et l'ester 4-iodophénylboronique commercial suivant une réaction de Sonogashira avec un rendement de 68%. Une réaction de Suzuki de **31** avec **29** permet ensuite d'obtenir le composé **00/00** (Figure 2- 42). En utilisant les mêmes conditions à partir de l'aniline **6**, le composé **02/00** n'est pas obtenu certainement à cause de la gêne stérique et de l'effet désactivant des atomes de brome.

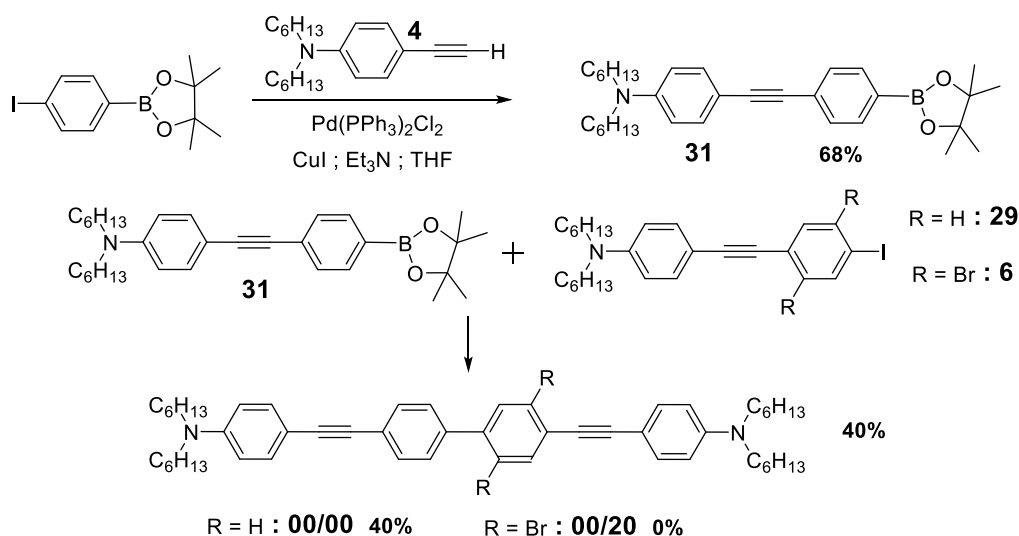


Figure 2- 42 : Synthèse de **00/00** et la limitation de l'utilisation du catalyseur $\text{Pd(PPh}_3)_4$.

La synthèse a donc été une nouvelle fois revue, et des optimisations des conditions de couplage de Suzuki ont alors été menées en amont sur des synthons plus facilement accessibles avec l'objectif d'introduire le couplage de Suzuki le plus tôt possible (Figure 2- 43). Différents catalyseurs et bases ont été testés dans le cadre de ces optimisations[241, 242]. Les résultats obtenus sont regroupés Tableau 2- 7. Le palladium [1,1'-bis (diphénylphosphino) ferrocène] dichloropalladium(II) (**dppf**) s'est révélé être un catalyseur particulièrement adapté à la réalisation de ce type de couplage, malgré la gêne stérique des atomes de brome[243-245]. L'utilisation de carbonate de césium en tant que base s'est également avérée bénéfique, permettant d'isoler le produit biphényle désymétrisé cible avec un rendement restant toutefois modeste. Après déprotection des alcynes et couplage de Sonogashira avec l'iodoaniline **2**, le composé **02/00** a finalement pu être isolé en quantité significative.

Catalyseur	base	Rendement
Pd(PPh ₃) ₄	AcOK	traces
Pd(dba) ₂	AcOK	traces
Pd(OAc) ₂	AcOK	traces
Pd(dppf)Cl ₂	AcOK	15%
Pd(dppf)Cl ₂	K ₂ CO ₃	15%
Pd(dppf)Cl ₂	Cs ₂ CO ₃	30%

Tableau 2- 7 : Effet du catalyseur sur le couplage de Suzuki dans le cas de 24.

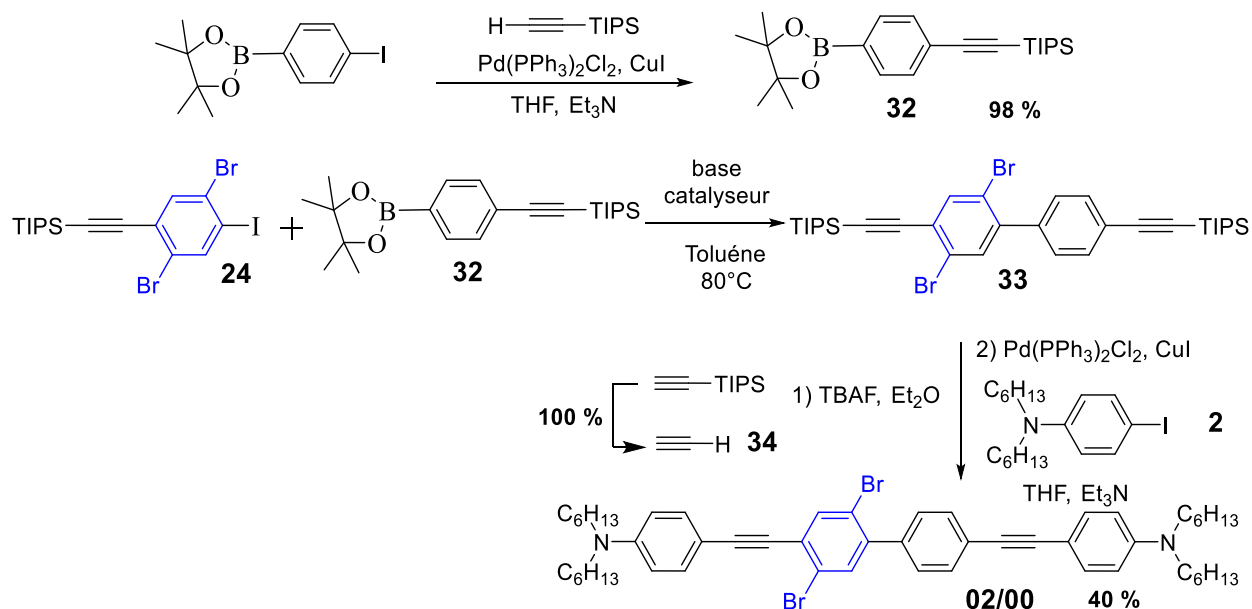


Figure 2- 43 : Stratégie de synthèse de 02/00.

Les conditions catalytiques ont alors été testées sur divers dérivés pour obtenir le pinacol-borane sur le cœur dibromo-phényle. Il apparaît dans tous les exemples testés que l'insertion du bore n'est possible qu'avec le $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ uniquement si le groupe phényle est suffisamment enrichi en électron, c'est-à-dire porteur d'un groupement mésomère donneur comme l'amine (Figure 2- 44, Tableau 2- 8). Une réaction de Suzuki permet d'obtenir le cœur central 2/2 (Figure 2- 45).

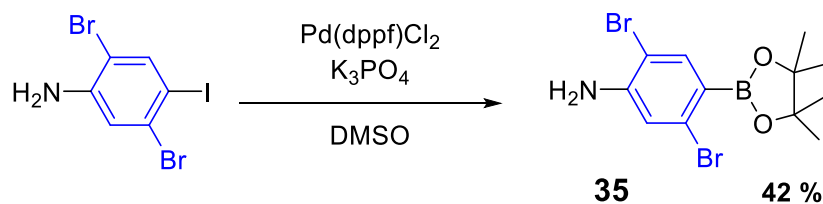


Figure 2- 44 : Obtention de l'ester boronique du cœur dibromobenzène.

Molécule	rendement
	traces
	traces
	42 %

Tableau 2- 8 : Essais pour obtenir le cœur dibromé.

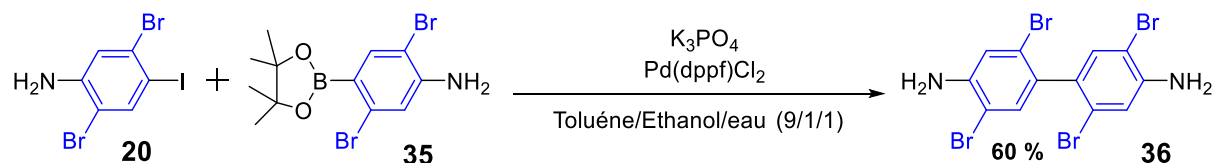


Figure 2- 45 : Couplage de Suzuki pour avoir le cœur 2/2.

La réaction de Sandmeyer permettant l'introduction des iodes terminaux a ensuite été réalisée (Figure 2- 46). Dans une première approche, le produit résultant est alors directement impliqué dans une réaction de Sonogashira avec l'alkyne **2**. Cependant cette approche n'a pas permis d'isoler le composé **02/20** car le produit d'homocouplage possède un rapport frontal identique au composé cible, ce qui empêche d'isoler ce dernier sur colonne de silice. Dans une approche alternative impliquant deux étapes de synthèse supplémentaires, on obtient le précurseur sous forme alcyne. Ce dernier couplé avec la iodo-dihexyle-aniline permet d'obtenir le composé **02/20**.

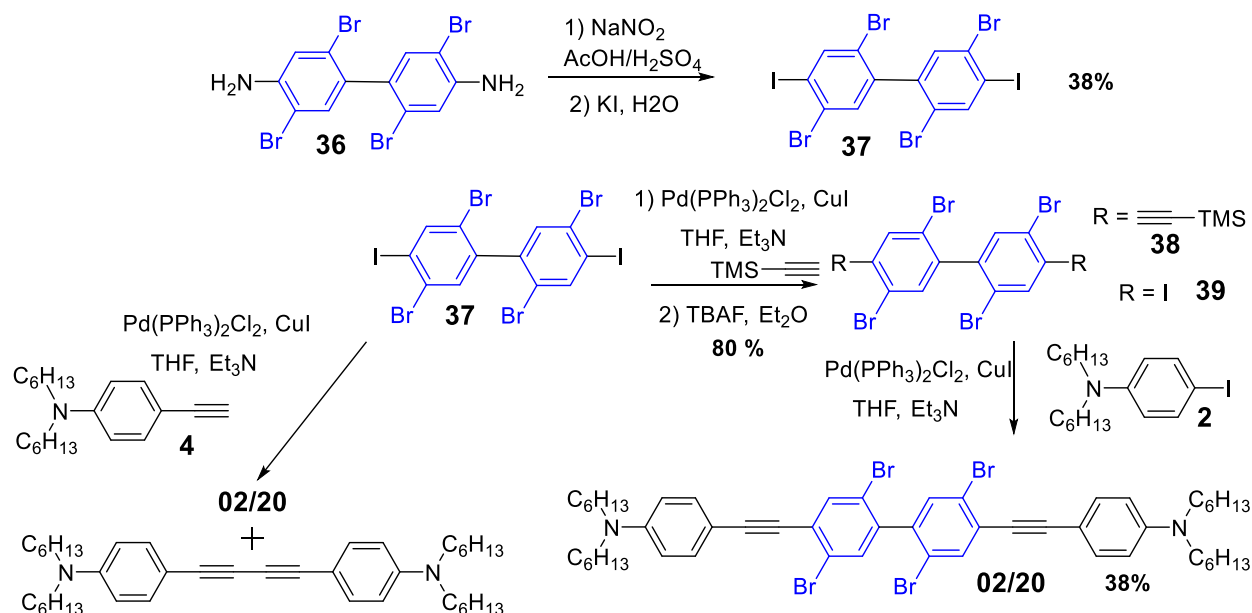


Figure 2- 46 : Synthèse de chromophore 02/20.

IV Etude spectroscopique : relation structure réactivité

IV.1) Résultats des études spectroscopiques

IV.1.a) Expériences réalisées

L'ensemble des études spectroscopiques a été réalisé dans le chloroforme. L'absorption linéaire est caractérisée par la longueur d'onde ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$) et le coefficient d'absorption molaire (ϵ). Les spectres d'absorption à deux photons sont mesurés par la méthode de fluorescence induite à deux photons dans une gamme allant 700 nm à 900 nm (laser Ti-Saphir). L'ADP est caractérisée par la longueur d'onde ($\lambda_{\text{TPA}}^{\text{max}}$) et la valeur de section efficace ($\sigma_{\text{TPA}}^{\text{max}}$). L'émission à partir des états excités est évaluée par l'étude de la fluorescence et de la génération d'oxygène singlet. Le phénomène de fluorescence est caractérisé par la position du maximum de fluorescence ($\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$), le rendement quantique de fluorescence (ϕ_F) et le temps de vie de fluorescence (τ_F), la génération d'oxygène singlet par la mesure du rendement quantique de génération de l'oxygène singlet (ϕ_Δ). A partir des données de fluorescence on peut remonter aux constantes cinétiques d'émission radiative (k_r) et non-radiative (k_{nr}) grâce aux relations suivantes :

$$k_r = \frac{\phi_F}{\tau_F} \quad k_{nr} = \frac{1}{\tau_F} - k_r$$

La figure de mérite (f) est calculée à 800nm, longueur d'onde d'utilisation optimale du laser Ti-Saphir.

Nous allons dans le cadre de notre étude définir un nouveau paramètre : le rendement utile. Il est défini comme le rendement quantique de l'ensemble des phénomènes permettant d'arriver un phénomène d'intérêt. Ici les phénomènes d'intérêt sont la fluorescence et la génération d'oxygène singulet.

$$\varphi_u = \varphi_f + \varphi_{O_2}$$

IV.1.b) Données expérimentales

Les tableaux suivant regroupent l'ensemble des résultats spectroscopiques mesurés (Tableau 2- 9, Tableau 2- 10).

IV.2) Propriétés spectroscopiques linéaires

IV.2.a) Absorption et émission

Des bandes larges et sans structure vibronique sont observées à la fois en absorption et en émission, caractéristiques d'un état excité présentant un fort caractère de transfert de charge, ce qui est classiquement observé dans le cas de structures quadripolaires de type D- π -A- π -D. Les données normalisées des absorptions et des émissions sont reportées Figure 2- 47, Figure 2- 48, Figure 2- 49, Figure 2- 50, Figure 2- 51 et Figure 2- 52.

	020	040	0000	0200	0220	00-00	02-00	02-20	00/00	02/00	02/20
$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ (nm)	421	447	387	409	425	401	424	437	374	379	383
ϵ (L.cm ⁻¹ .mol ⁻¹)	91500	78865	86066	88611	42064	56549	80950	77718	79796	64762	66163
$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)	458	492	459	489	522	484	518	535	449	465	470
φ_f	0,25	0,09	0,8	0,39	0,31	0,79	0,27	0,29	0,9	0,39	0,16
φ_{Δ}	0,53	0,33	0	0,44	0,53	0	0,54	0,55	0	0,26	0,34
$\varphi_f + \varphi_{\Delta}$	0,78	0,42	0,8	0,83	0,84	0,79	0,81	0,84	0,9	0,65	0,5
Déplacement de Stokes (cm⁻¹)	1919	2046	4053	4000	4372	4276	4280	4192	4466	4880	4833
$\lambda_{\text{TPA}}^{\text{max}}$ (nm)	730	780	< 710	760	810	750	800	840	< 720	< 720	< 730
$\sigma_{\text{TPA}}^{\text{max}}$ (GM)	689	376	1451	998	404	600	805	1221	>249	>997	>314
$\sigma_{\text{TPA}, 800}$ (GM)	75	182	313	667	400	373	805	939	33	142	70
$\sigma_{\text{TPA}, 800} * \phi_{\Delta}$	40	60	0	293	212	0	435	516	0	37	24
τ_F (ns)	0,26	0,15	1,11	0,71	0,69	1,20	0,70	0,74	1,07	0,36	0,30
kr (s⁻¹)	9,6.10 ⁸	6,0.10 ⁸	7,2.10 ⁸	5,5.10 ⁸	4,5.10 ⁸	6,6.10 ⁸	3,9.10 ⁸	3,9.10 ⁸	8,4.10 ⁸	1,1.10 ⁹	5,3.10 ⁸
knr (s⁻¹)	2,9.10 ⁹	6,1.10 ⁹	1,8.10 ⁸	8,6.10 ⁸	1,0.10 ⁹	1,8.10 ⁸	1,0.10 ⁹	9,6.10 ⁸	9,4.10 ⁷	1,7.10 ⁹	2,8.10 ⁹

Tableau 2- 9 : Données spectroscopiques de la référence 020, de la famille des quadrimères et des composés octupolaires.

	202	00000	02000	00200	02200	02020	02220	O₀(20)₃	O₃(0)₃	O₃(00)₃
$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ (nm)	362	389	408	394	425	421	435	413	396	400
ϵ (L.cm ⁻¹ .mol ⁻¹)	65806	97131	92021	40454	87394	98127	62653	92227	139941	133096
$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)	420	477	499	491	548	510	557	494	420	502
ϕ_f	0,09	0,82	0,41	0,74	0,41	0,44	0,40	0,16	0,01	0,18
ϕ_{Δ}	0,04	0,00	0,43	0,11	0,46	0,44	0,48	0,39	0,17	0,48
$\phi_f + \phi_{\Delta}$	0,13	0,82	0,84	0,85	0,87	0,88	0,88	0,55	0,18	0,66
Déplacement de Stokes (cm ⁻¹)	4422	4743	4470	5014	5281	4145	5035	3970	1443	5080
$\lambda_{\text{TPA}}^{\text{max}}$ (nm)	750	730	770	750	820	810	850	810	< 730	760
$\sigma_{\text{TPA}}^{\text{max}}$ (GM)	32	832	432	460	745	690	489	214	> 69	725
$\sigma_{\text{TPA}, 800}$ (GM)	6	406	381	250	680	652	308	205	36	652
$\sigma_{\text{TPA}, 800} * \phi_{\Delta}$	0	0	164	28	313	287	148	80	6	313
τ_F (ns)	0,03	1,35	0,74	1,25	0,68	0,82	1,17	0,51	0,12	0,22
kr (s ⁻¹)	3,0.10 ⁹	6,1.10 ⁸	5,5.10 ⁸	5,9.10 ⁸	6,0.10 ⁸	5,4.10 ⁸	3,4.10 ⁸	3,1.10 ⁸	8,3.10 ⁷	8,2.10 ⁸
k_{nr} (s ⁻¹)	3,0.10 ¹⁰	1,3.10 ⁸	8,0.10 ⁸	2,1.10 ⁸	8,7.10 ⁸	6,8.10 ⁸	5,1.10 ⁸	1,6.10 ⁹	8,3.10 ⁹	3,7.10 ⁹

Tableau 2- 10 : Données spectroscopiques des trimères et pentamères.

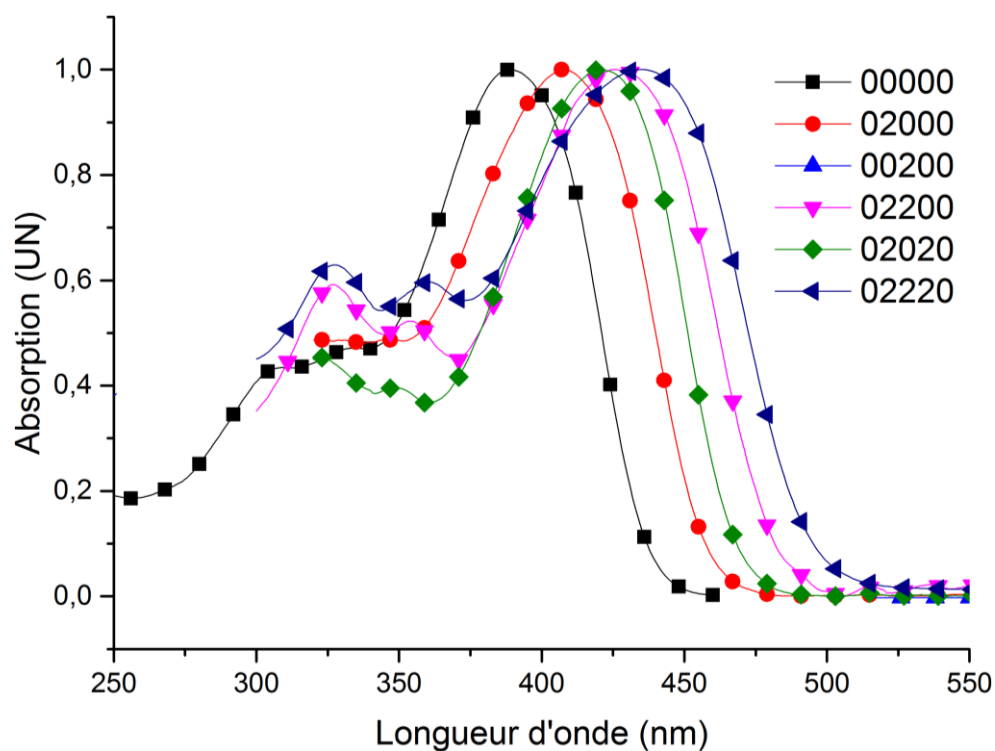


Figure 2- 47 : Absorption des composés de la famille des pentamères.

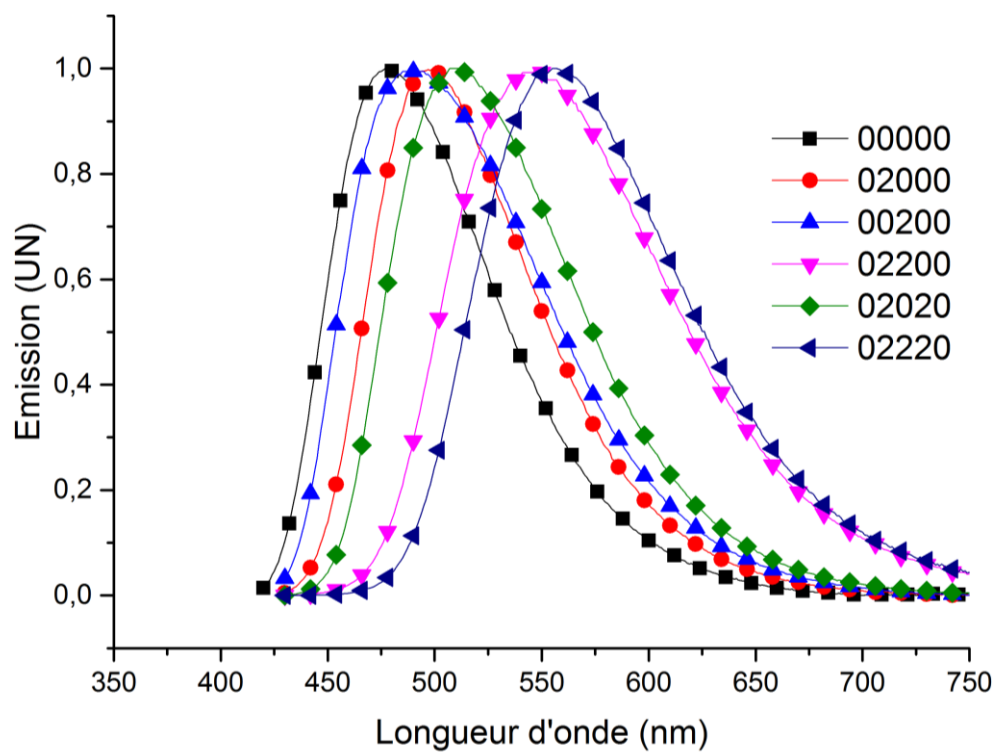


Figure 2- 48 : Emission des composés de la famille des pentamères.

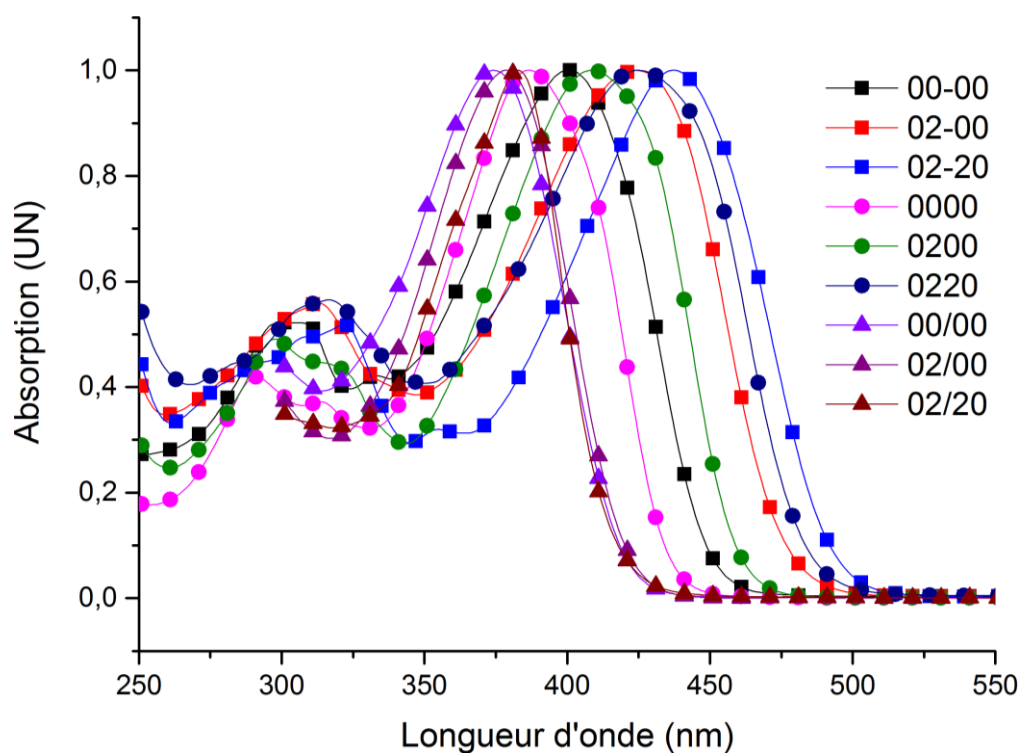


Figure 2- 49 : Absorption des composés des différentes familles des tétramères.

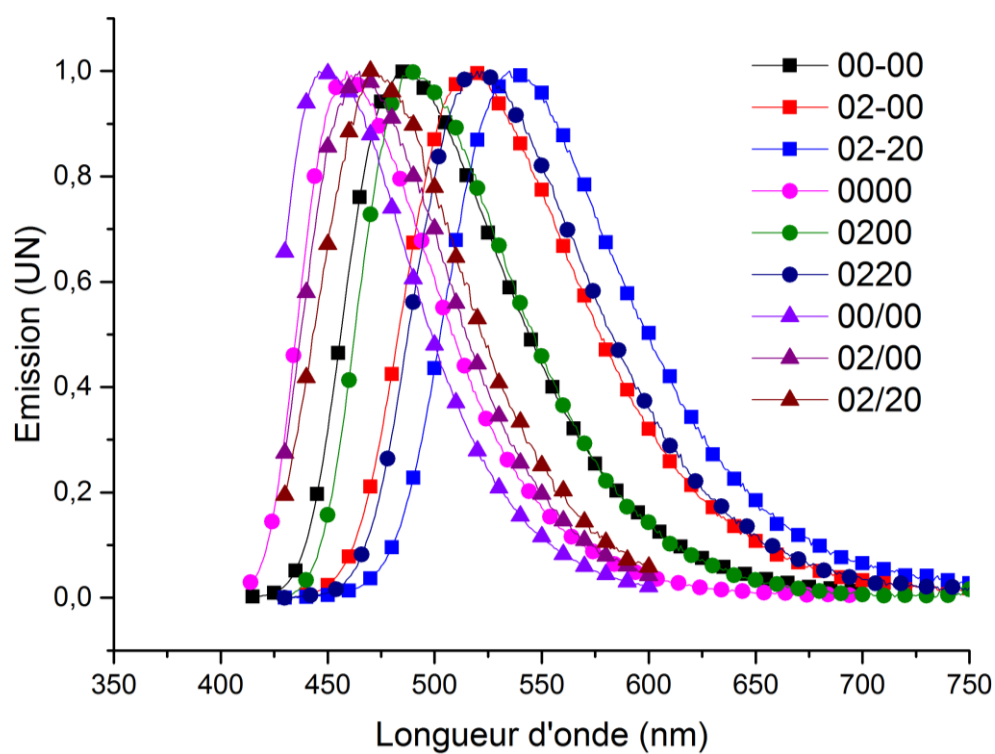


Figure 2- 50 : Emission des composés des différentes familles des tétramères.

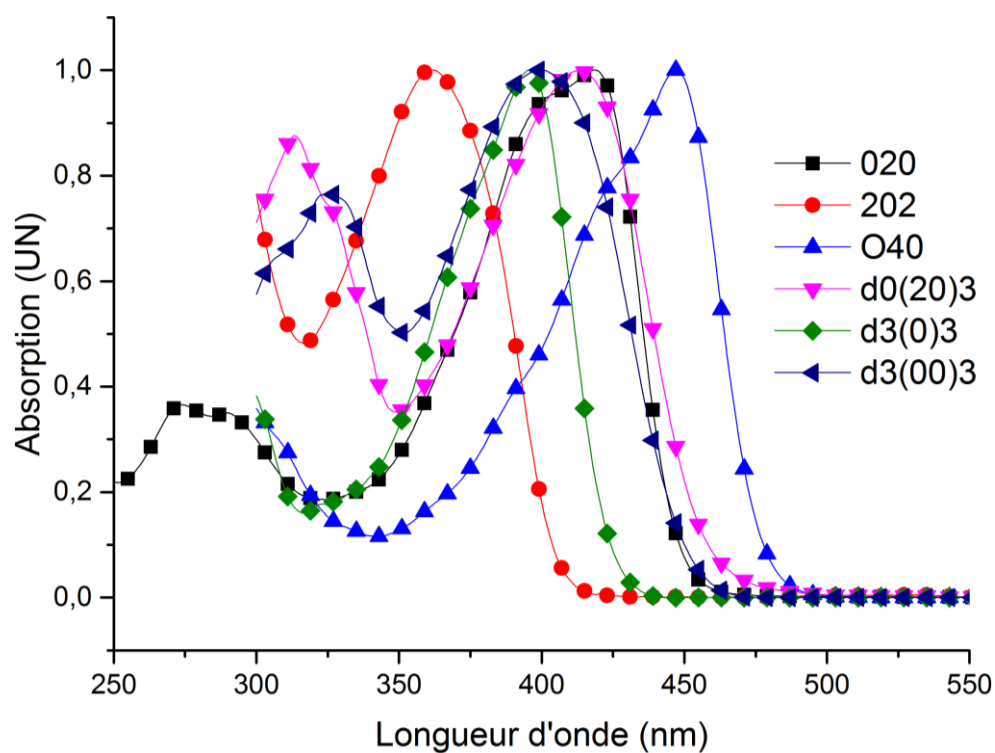


Figure 2- 51 : Absorption des composés de la famille des trimères et de symétrie octupolaire.

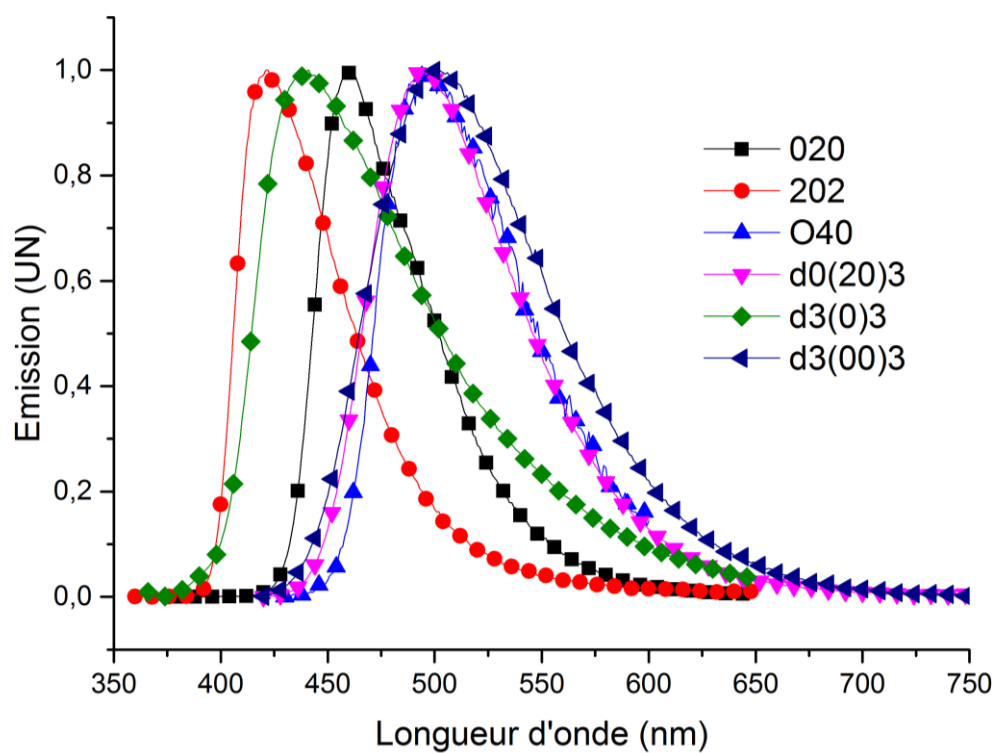


Figure 2- 52 : Emission des composés de la famille des trimères et de symétrie octupolaire.

IV.2.a.i) Effets de la longueur de conjugaison

De façon générale, on constate que l'augmentation de la longueur du squelette conjugué provoque un effet bathochrome modéré sur les bandes d'absorption, beaucoup plus notable sur les bandes d'émission des composés (Figure 2- 53, Figure 2- 54). Les variations observées pour le spectre d'absorption sont faibles et difficilement interprétables (bandes larges généralement centrées autour de 420 nm), excepté pour les composés tétramères à espaceur central biphényle où un net effet hypsochrome est observé (**02/00** : 379 nm, **02/20** : 383nm), ce qui peut être corrélé à une rupture partielle de la conjugaison du fait d'interactions stériques défavorables à la planéité du système.

Le décalage bathochrome du spectre d'émission augmente régulièrement lorsqu'on passe de la famille trimères (**020** : 458 nm) aux tétramères biphényles (**02/00** : 465 nm, **02/20** : 470 nm) puis aux tétramères (**0200** : 489 nm ; **0220** : 522 nm), et enfin aux tétramères à pont diyne (**02-00** : 518 nm ; **02-20** : 535 nm). Bien que les pentamères possèdent a priori une plateforme électronique plus étendue, le décalage bathochrome tend à décroître au sein de cette famille, et est comparable à celui observé pour les tétramères simples (**00200** : 491 nm ; **02020** : 510 nm). Ceci semble suggérer une saturation de l'effet d'allongement de la structure π -conjuguée sur la délocalisation électronique qui peut être attribuée à une distorsion de Peierls (cf A.I.2.d.iii). La modélisation théorique de la géométrie de l'état fondamental montre en effet la présence d'un angle de courbure, comme nous le développerons par la suite. Cette torsion peut expliquer une moins bonne délocalisation électronique, résultant en un décalage bathochrome moins prononcé pour cette famille.

Des tendances globalement similaires sont constatées dans les familles octupolaires. Si l'absorption reste globalement centrée autour de 400 nm, le maximum d'émission est nettement décalé vers le rouge sous l'effet de l'allongement des substituants périphériques (**0₃(0)₃** : 420 nm ; **0₃(00)₃** : 502 nm).

Ce bathochromisme d'émission présente un intérêt particulier dans le cadre des applications ciblées, car il permet d'envisager des stratégies de modifications de ce type de chromophore afin de déplacer leurs longueurs d'onde d'émission vers la fenêtre de transparence biologique (voir chapitre 3).

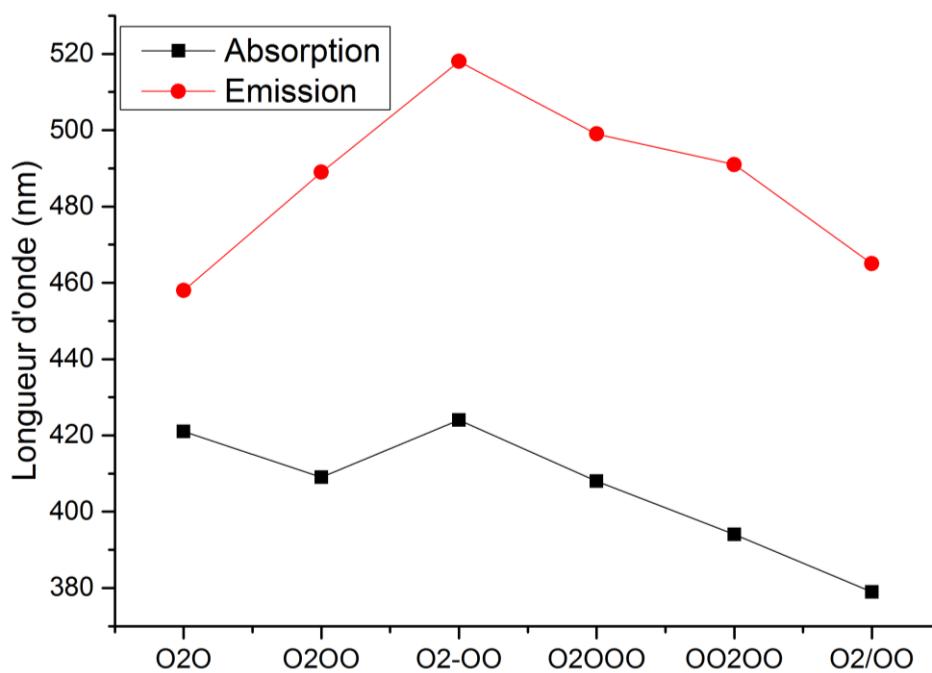


Figure 2- 53 : Evolution de l'absorption et de l'émission des composés di-bromés.

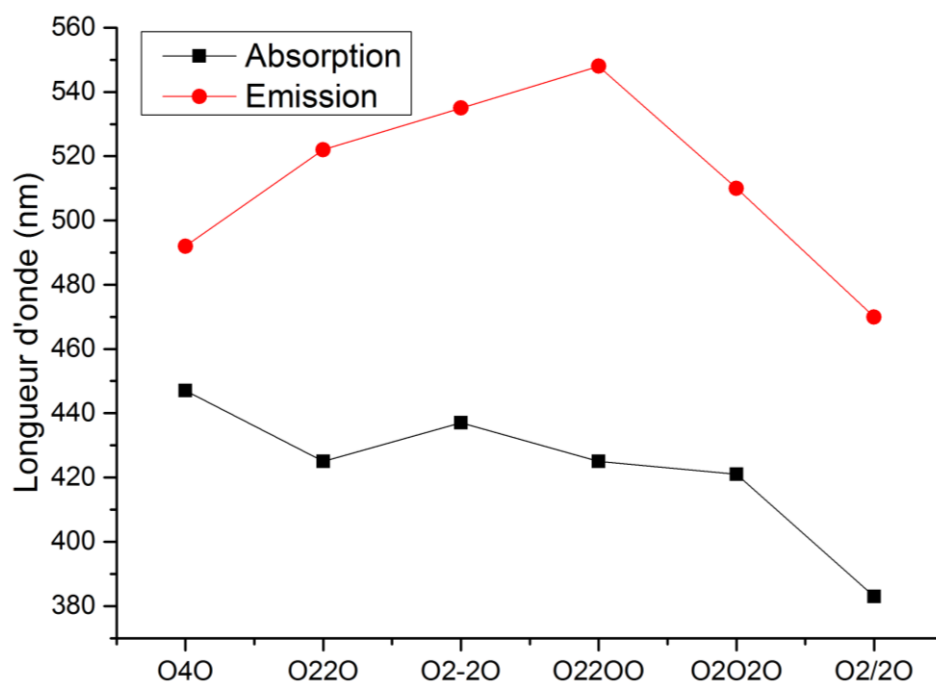


Figure 2- 54 : Evolution de l'absorption et de l'émission des composés tétra-bromés.

IV.2.a.ii)

Effet de l'augmentation du nombre de bromés

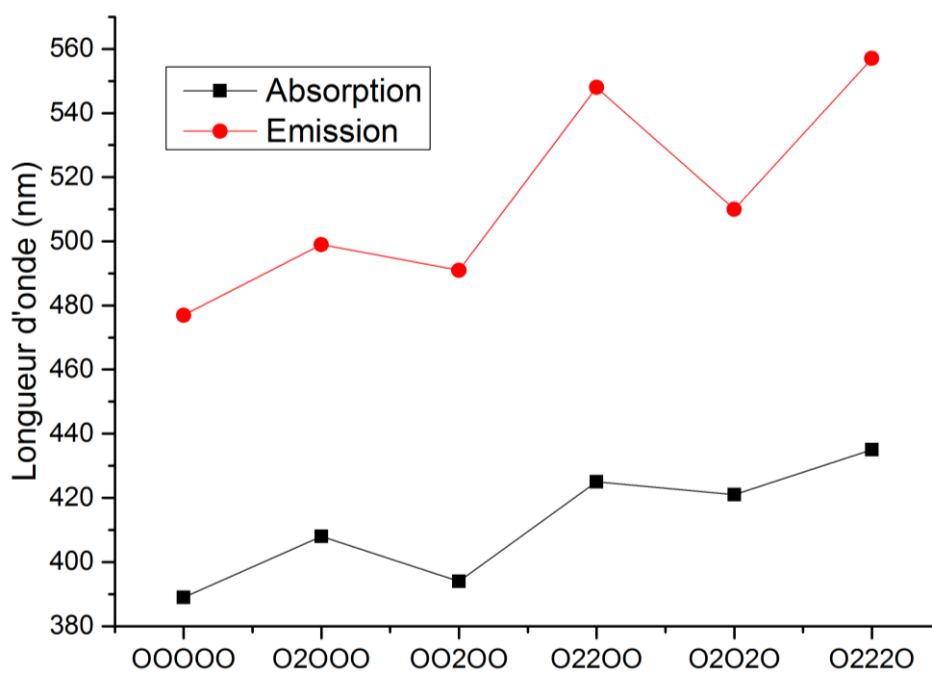


Figure 2- 55 : Evolution de l'absorption et de l'émission des pentamères.

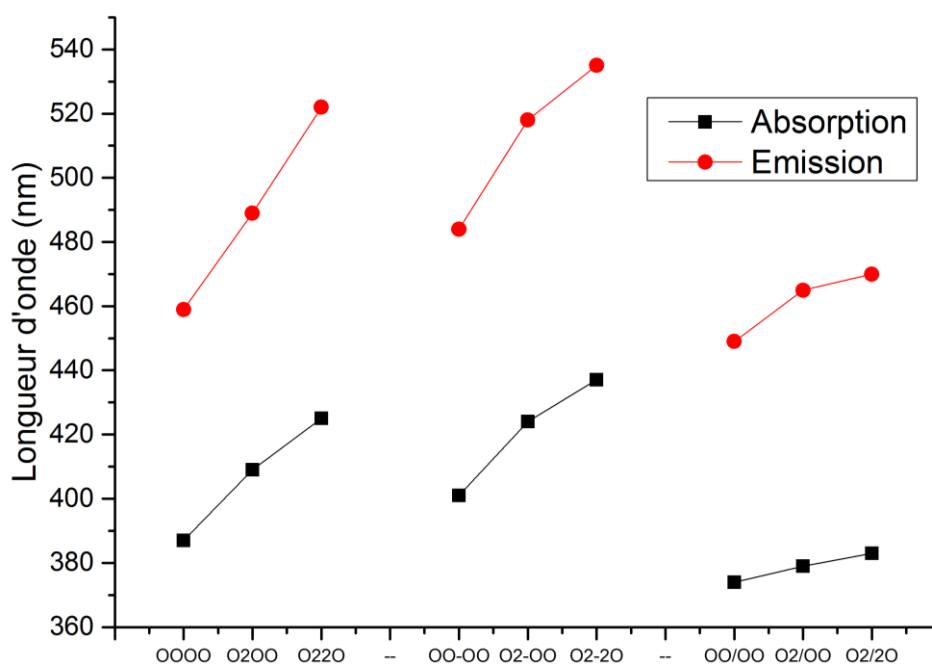


Figure 2- 56 : Evolution de l'absorption et de l'émission des tétramères.

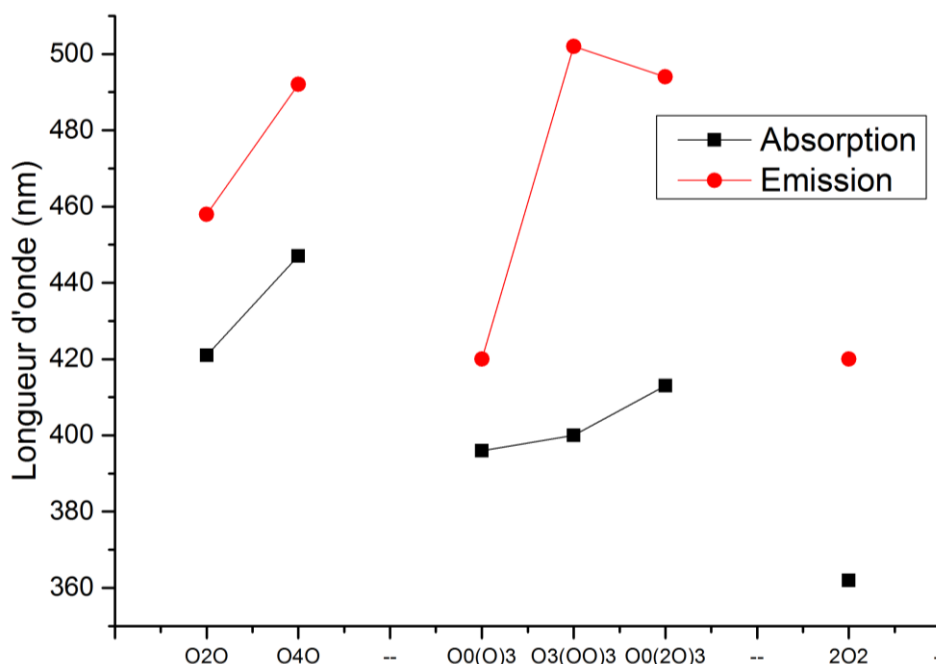


Figure 2- 57 : Evolution de l'absorption et de l'émission dans les autres familles.

De manière générale, au sein d'une famille donnée, l'augmentation du nombre de bromes portés sur la structure π -conjuguée provoque un décalage bathochrome. A la différence des observations pour la longueur de conjugaison, cet effet se retrouve aussi bien sur les spectres d'absorption que d'émission, et dans des proportions similaires. Les pentamères appartiennent à la famille dont la variation du nombre de bromes peut être analysée de la manière la plus complète. Dans cette famille, l'augmentation globale du nombre d'atomes de brome au sein de la structure (de **00000** à **02220**) génère un déplacement bathochrome progressif de la bande d'absorption de 389 à 435 nm et de la bande d'émission de 477 à 557 nm (Figure 2- 55). La variation peut être expliquée par un effet électronique, majoritairement inductif attracteur, de l'atome de brome, qui contribue à abaisser le niveau énergétique de l'état excité à transfert de charge S_1 . En d'autres termes, l'augmentation du nombre de bromes dans la partie centrale de la molécule augmente la dissymétrie électronique entre le centre et la périphérie, et donc le caractère quadripolaire, ce qui contribue à accentuer le transfert de charge.

On peut par ailleurs voir, à nombre de brome égal (**02020** et **02200**, ou encore **00200** et **02000**) que cet effet bathochrome est plus marqué lorsque la molécule est dissymétrique (Figure 2- 55). Un effet bathochrome similaire sous l'effet de la substitution par des atomes de brome est également observé au sein des familles suivantes :

- tétramère avec un pont alcyne (Figure 2- 56),
- tétramère avec un pont diyne (Figure 2- 56),
- tétramère de type bi-phényle (Figure 2- 56),

- **040** par rapport à la **020** (Figure 2- 57),
- Octupôle substitués par six atomes de brome par rapport à celui à trois bromes (Figure 2- 57).

La valeur de λ_{abs}^{max} de **02220** et **040** montrent que l'effet des brome est plus marqué quand la substitution est « concentrée » au centre de molécules courtes (λ_{abs}^{max} (**040**)=445 nm et λ_{abs}^{max} (**02220**)=437 nm).

Comme on pouvait s'y attendre, une évolution différente est observée lorsque les anilines sont substituées par des atomes de brome. Dans le composé **202**, le caractère électro-donneur des anilines est fortement contrebalancé par la présence des substituants électroattracteurs directement sur le cycle, ce qui conduit à une perte de caractère de transfert de charge de la transition électronique $S_0 \rightarrow S_1$ associée, d'où un effet hypsochrome très marqué par rapport à son régioisomère **040**.

IV.2.b) Déplacement de Stokes

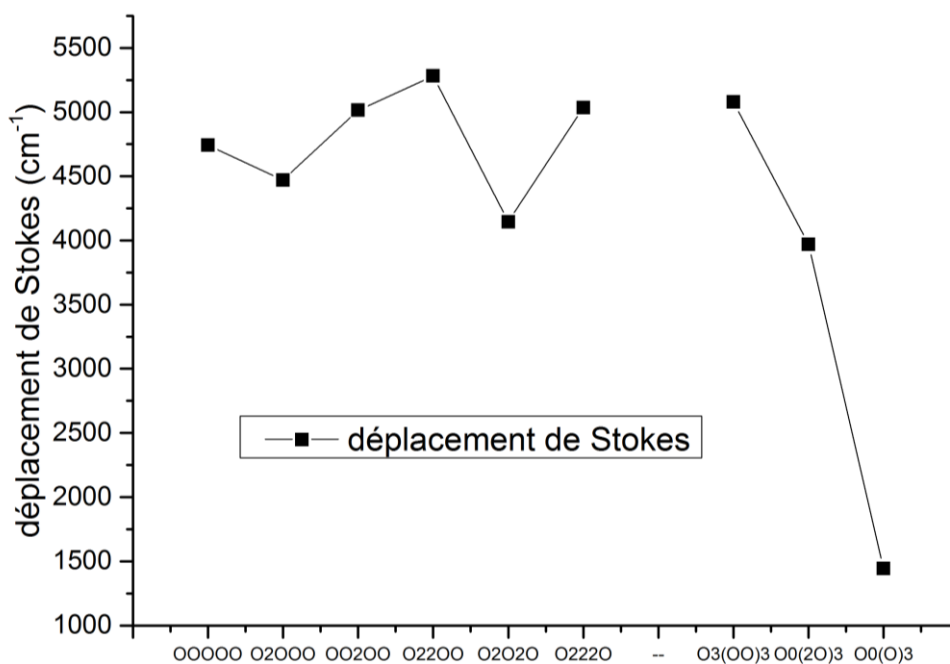


Figure 2- 58 : Déplacement de Stokes des pentamères et des octupôles.

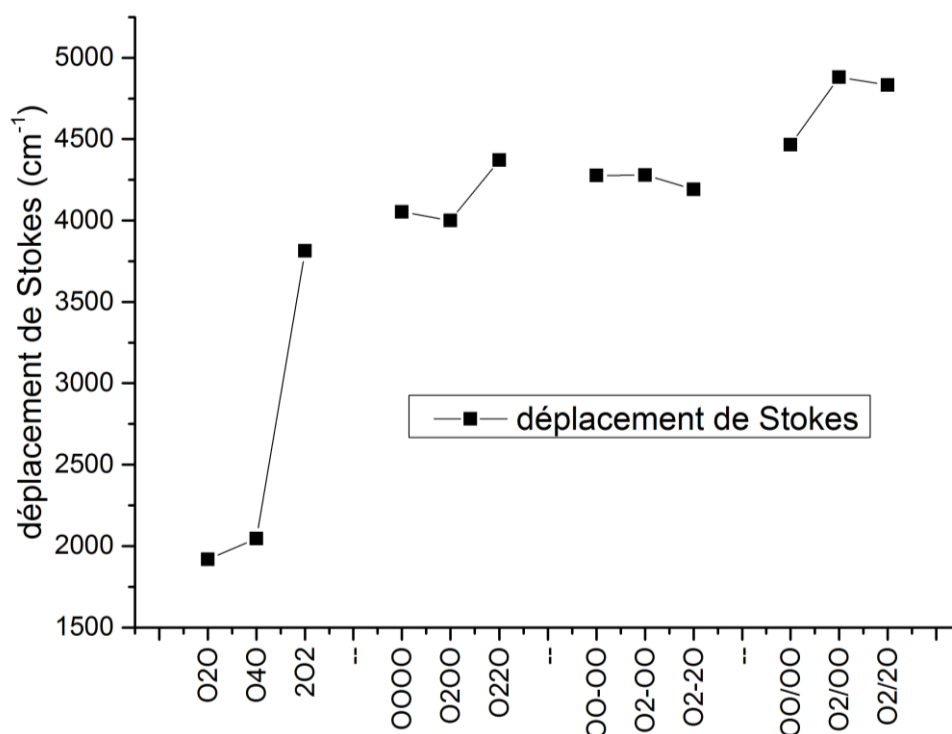


Figure 2- 59 : Déplacement de Stokes des trimères et des tétramères.

Le déplacement de Stokes, qui trouve son origine dans une réorganisation électronique importante de la structure du chromophore et de son environnement chimique entre l'état fondamental et l'état excité, est une bonne indication de changements de géométrie intervenant au cours de l'excitation. Il varie notablement entre les différentes familles (Figure 2- 58, Figure 2- 59). Ici, l'état excité est de nature cumulénique/quinoïdal, ce qui implique que toute présence de distorsion à l'état fondamental impose des réorganisations électroniques et configurationnelles consécutives à l'excitation pour atteindre une géométrie plane[246].

Là encore, il apparaît de manière générale que la longueur de conjugaison est le principal paramètre influençant le déplacement de Stokes. Pour les trimères, un déplacement moyen de 2000 cm^{-1} est calculé, il est proche de 4100 cm^{-1} pour les tétramères simples, légèrement supérieur (4200 cm^{-1}) pour les tétramères à espaceur central diyne et il atteint 4800 cm^{-1} pour les pentamères. Cette valeur très importante peut être expliquée par la distorsion de l'état fondamental au sein de cette dernière famille, comme évoqué précédemment à propos de la saturation de l'effet bathochrome. Ce phénomène implique une forte réorganisation à l'état excité. Un effet similaire est observé dans les tétramères à liaison centrale de type biphényle. Alors que la longueur de conjugaison est plus faible, la torsion imposée à l'état fondamental induit une plus forte réorganisation à l'état excité, conduisant à des déplacements de Stokes de l'ordre de 4400 cm^{-1} . Les composés octupolaires suivent également la tendance générale, avec une nette augmentation du déplacement de Stokes avec la longueur de conjugaison.

Au sein d'une famille donnée, les évolutions semblent relativement peu corrélées aux changements de la substitution en brome : seule une légère augmentation du déplacement de Stokes est généralement observée. Cette augmentation est probablement attribuable à de l'augmentation moment quadripolaire qui peut être relié à la dissymétrie électronique. Cette observation doit néanmoins être nuancée pour la famille des pentamères, où l'on peut voir que l'amplitude du déplacement de Stokes est fortement corrélée à la position des atomes de brome. Quand il n'y a pas de brome en position centrale (**02000** et **02020**) le déplacement de Stokes est de 4000 cm^{-1} , il est de 5000 cm^{-1} quand la position centrale est occupée (**00200**, **02200**, **02220**). Cette évolution peut être expliquée par une augmentation de la distance du transfert de charge sous l'effet de la présence de ce substituant central. Une observation similaire peut être faite pour les octupôles. Pour le dérivé **O₀(20)₃** le déplacement de Stokes est de 4000 cm^{-1} alors qu'il est de 5000 cm^{-1} pour **O₃(00)₃**. La distance entre le groupe donneur (aniline) et le centre accepteur (brome) plus importante peut également expliquer cette différence.

Un cas particulier est le composé **O₃(0)₃** qui se rapproche des composés **020** et **040** avec respectivement des déplacements de Stokes de 1443 cm^{-1} , 1919 cm^{-1} et 2046 cm^{-1} . Dans ces molécules courtes, il y a très peu de réarrangement.

De ces observations, il apparaît clairement que deux effets semblent se combiner pour concourir à l'augmentation du déplacement de Stokes :

1/ l'augmentation de l'efficacité et de la distance de transfert de charge au sein du chromophore, qui implique une réorganisation plus importante de l'environnement de solvation de la molécule.

2/ l'apparition de distorsions au sein de la molécule à son état fondamental qui implique une réorganisation conséquente pour conduire à l'état excité quinoïdal.

Afin de confirmer ces observations, nous avons décidé d'entreprendre des calculs théoriques.

IV.2.c) Calculs théoriques : rationalisations des observations expérimentales

Les calculs théoriques ont été réalisés en utilisant la fonctionnelle Cam-B3LYP/6-31+G(d), en collaboration avec Tanguy LE BAHERS au laboratoire. Cette fonctionnelle a donné, d'après la littérature, de bon résultats pour les molécules à transfert de charge de masse moléculaire élevée (voir annexe). Elle permet de calculer avec une précision acceptable la surface d'énergie de l'état fondamental et des premiers états excités. La taille importante des molécules étudiées rend les temps de calculs associés particulièrement longs. Pour les simplifier légèrement, les chaînes hexyles ont été substituées dans les modèles par des groupements méthyles. L'effet du

solvant à l'état fondamental est calculé et est désigné sous le nom DFT-LR. Si l'effet du solvant est recalculé à l'état excité, il est désigné sous le nom DFT-cLR. Pour prendre en compte les effets vibrationnels qui peuvent être importants dans les molécules à fort transfert de charge, des calculs des niveaux vibrationnels ont été réalisés en utilisant le code Gaussian dont les résultats sont traités par le logiciel FCCLASSES. Ces calculs, nécessitant des temps de calcul extrêmement longs, n'ont été menés que sur un nombre restreint de molécules. A partir de la géométrie optimisée, différents énergies et angles peuvent être déterminés.

Les calculs de DFT ont permis de déterminer les maximums d'absorption et d'émission. Le travail sur la géométrie des états électroniques a permis de mettre en évidence une faible distorsion dans certaines molécules à l'état fondamental selon l'angle dièdre θ (Figure 2- 60). Il est calculé sur la liaison centrale où le nombre de bromes est le plus important. Un angle de courbure (α) est aussi observé pour certaines molécules ; il est calculé en prenant les atomes d'azote et un atome imaginaire au centre de la molécule (Figure 2- 60).

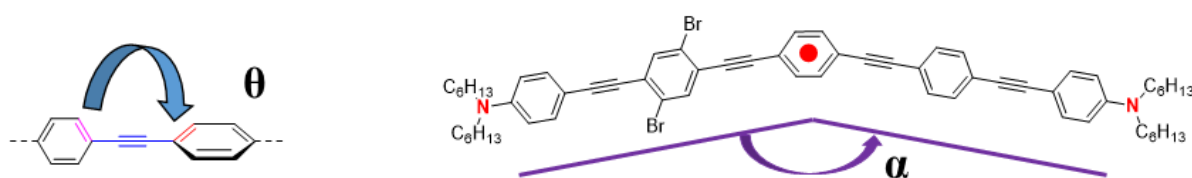


Figure 2- 60 : Visualisation de l'angle dièdre et de l'angle de courbure de la molécule.

Les résultats obtenus pour les valeurs de longueurs d'onde d'absorption et d'émission calculées, s'accordent bien avec les résultats expérimentaux, les déviations observées restant dans la barre d'erreurs des méthodes de calculs. On peut noter que la méthode DFT-cLR, bien qu'en théorie plus performante que la méthode DFT-LR, donne de moins bons résultats en condition standard dans le cas de nos molécules. Les résultats sont améliorés uniquement si elle est menée en prenant en compte les états vibroniques des états S_0 et S_1 . L'ensemble de ces résultats est présenté Tableau 2- 11 et Tableau 2- 12.

De manière assez surprenante, malgré leur taille importante et leur positionnement sur des noyaux aromatiques parfois voisins, les atomes de brome ne semblent induire que très peu de gêne stérique. Au lieu de provoquer une distorsion, les bromes semblent au contraire contribuer à rigidifier la structure à l'état fondamental : ainsi, les pentamères symétriques tétra ou hexa bromés ont un minimum d'énergie lorsqu'ils sont plans. A l'état excité, l'optimisation énergétique est atteinte pour un angle α de 180° synonyme d'un transfert de charge sur l'ensemble de la molécule. De manière générale l'angle dièdre correspondant à la géométrie la plus stable de l'état fondamental est nul. La famille des tétramères biphényles échappe bien sûr

à cette règle, la liaison biphenyle induisant, comme attendu, un angle dièdre très important (Figure 2- 61). Par ailleurs, on constate dans cette molécule que l'encombrement stérique des atomes de brome augmente cette distorsion, ce qui peut expliquer les évolutions observées au sein de cette famille concernant les déplacements de Stokes.

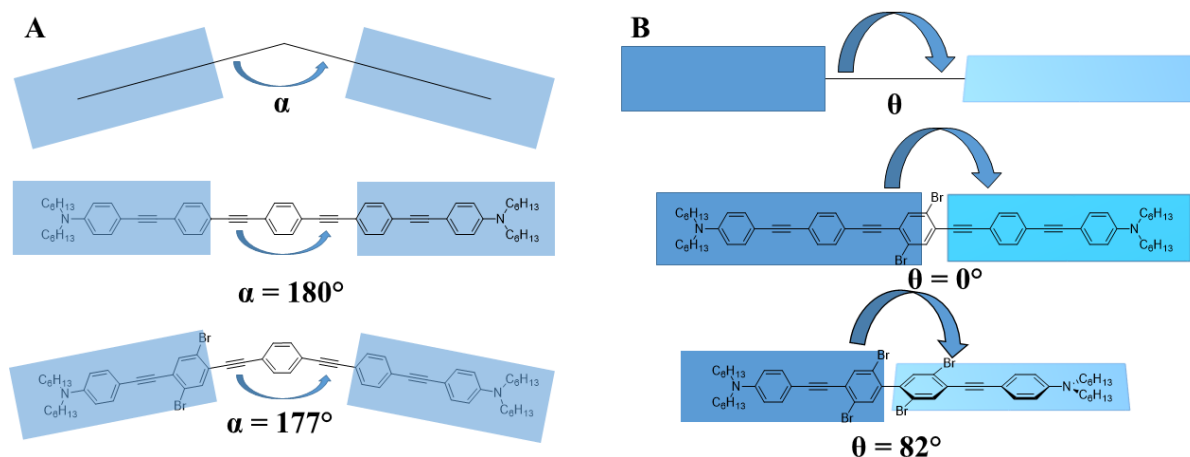


Figure 2- 61 : Exemple de variation d'angle : distinguer l'état fondamental de l'état excité.

Molécules	Etat fondamental S_0		Etats excités S_1	
	Angle dièdre θ (°)	Angle courbure α (°)	Angle dièdre θ (°)	Angle courbure α (°)
O2O	0,0	179,3	0,0	180,0
O4O	0,0	180,0	0,0	180,0
2O2	0,7	179,7	0,9	179,8
OOOO	1,3	179,9	2,1	180,0
O2OO	0,0	179,8	36,0	173,6
O22O	0,0	179,9	62,1	178,2
OO-OO	3,5	179,6	0,0	180,0
O2-OO	0,0	176,4	0,0	178,4
O2-2O	0,0	179,9	0,0	180,0
OO/OO	37,6	179,9	0,0	180,0
O2/OO	59,5	176,1	0,0	175,6
O2/2O	82,0	179,5	0,0	179,9
OOOOO	0,0	180,0	0,0	180,0
O2OOO	0,0	177,2	0,0	180,0
OO2OO	0,0	179,6	0,0	176,5
O22OO	0,0	177,5	0,0	179,4
O2O2O	0,0	180,0	0,0	177,9
O222O	0,0	179,5	0,0	180,0

Tableau 2- 11 : Evolution des angles à l'état fondamental et à l'état excité des composés poly-bromés.

Molécules	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)	Déplacement de Stokes (cm ⁻¹)	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)	Déplacement de Stokes (cm ⁻¹)	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)	Déplacement de Stokes (cm ⁻¹)	Erreur λ_{abs} (eV)	Erreur λ_{em} (eV)	Erreur Déplacement de Stokes (eV)	Erreur λ_{abs} (eV)	Erreur λ_{em} (eV)	Erreur Déplacement de Stokes (eV)
	DFT-LR			DFT-cLR			Expérimentale			DFT-LR			DFT-cLR		
O2O	373	452	4686	366	425	3793	421	458	1919	0,38	0,04	0,11	0,44	0,21	0,23
O4O	391	471	4344	383	442	3485	447	492	2046	0,40	0,11	0,11	0,46	0,29	0,18
2O2	346	427	5483	339	403	4685	362	420	3815	0,16	-0,05	0,10	0,23	0,12	0,11
OOOO	371	450	4732	365	428	4033	387	459	4053	0,14	0,05	0,09	0,19	0,20	0,00
O2OO	384	464	4490	378	442	3831	409	489	4000	0,20	0,14	0,08	0,25	0,27	-0,02
O22O	395	477	4352	389	455	3729	425	522	4372	0,22	0,22	0,08	0,27	0,35	-0,08
OO-OO	383	470	4833	377	448	4204	401	484	4276	0,15	0,08	0,08	0,20	0,21	-0,01
O2-OO	395	482	4570	390	460	3902	424	518	4280	0,21	0,18	0,08	0,25	0,30	-0,05
O2-2O	404	492	4427	399	471	3831	437	535	4192	0,23	0,20	0,07	0,27	0,31	-0,04
OO/OO	345	443	6412	340	421	5659	374	449	4466	0,28	0,04	0,09	0,33	0,18	0,15
O2/OO	341	426	5851	337	409	5224	379	465	4880	0,36	0,24	0,08	0,41	0,37	0,04
O2/2O	336	404	5008	332	388	4367	383	470	4833	0,45	0,43	0,08	0,50	0,56	-0,06
OOOOO	379	450	4163	373	432	3662	389	477	4743	0,08	0,16	0,06	0,14	0,27	-0,13
O2OOO	387	462	4195	382	444	3655	408	499	4470	0,16	0,20	0,07	0,21	0,31	-0,10
OO2OO	389	464	4155	384	447	3670	394	491	5014	0,04	0,15	0,06	0,08	0,25	-0,17
O22OO	396	475	4200	392	459	3724	425	548	5281	0,21	0,35	0,06	0,25	0,44	-0,19
O2O2O	392	462	3865	387	445	3368	421	510	4145	0,22	0,25	0,06	0,26	0,36	-0,10
O222O	402	475	3823	398	460	3386	435	557	5035	0,23	0,38	0,05	0,26	0,47	-0,20

Tableau 2- 12 : Évolutions de l'absorption et de l'émission selon la méthode de calcul et erreurs par rapport aux valeurs expérimentales.

Le caractère de transfert de charge de la molécule est mis en évidence, par le calcul théorique en calculant la différence de densité électronique entre les états S_1 et S_0 à géométrie fixée selon une transition de type Franck-Condon. Quelques molécules sont données en exemples (Figure 2- 62) ; les autres sont données en annexe.

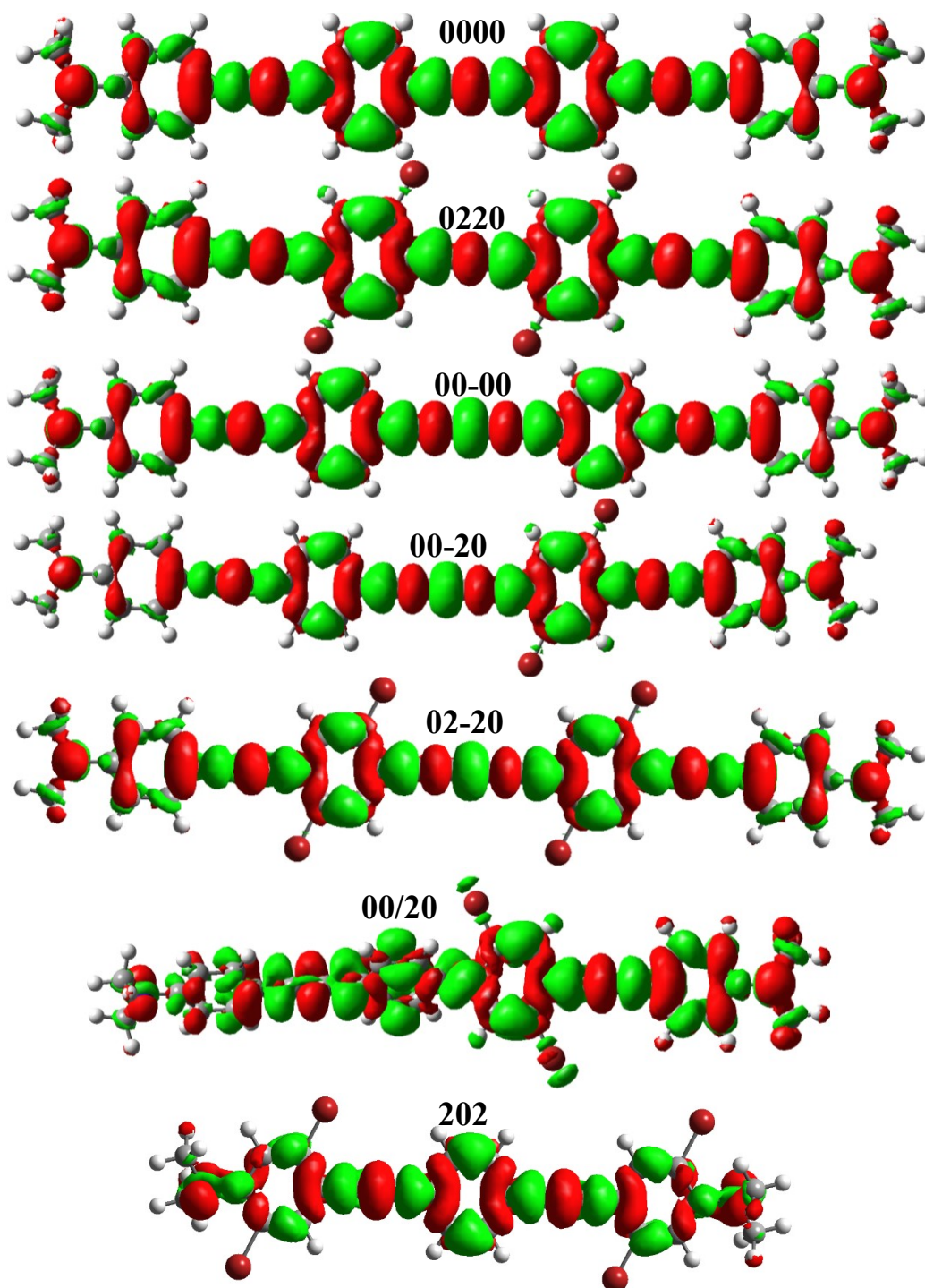


Figure 2- 62 : Exemple du transfert de charge, la diminution (augmentation) de la densité électronique entre l'état S_0 et l'état S_1 est marquée en rouge (vert).

Sur la Figure 2- 62, les zones en rouge montrent un appauvrissement de la densité électronique et les zones vertes une augmentation de cette dernière. Le transfert des anilines vers le centre des molécules est ainsi clairement mis en évidence. Cette représentation permet de mettre en évidence le caractère attracteur faible des atomes de brome. Les variations de densités électroniques entre les différentes molécules permettent de valider les hypothèses faites pour justifier les observations expérimentales : la redistribution électronique est plus forte en présence d'atomes de brome. La variation de densité est positive au niveau des centres bromés et négative au niveau des anilines. L'augmentation de la conjugaison n'a qu'un effet modéré sur la délocalisation. Les biphényles montrent une redistribution électronique plus visible cohérente avec l'état fondamental fortement contraint. Les bromes portés par l'aniline localisent le transfert d'électrons (alternance lobe rouge et vert).

IV.3) Absorption à deux photons

Les spectres d'absorption à deux photons dans le chloroforme des différents composés de l'étude sont présentés Figure 2- 66, Figure 2- 67 et Figure 2- 68, en parallèle aux spectres d'absorption à un photon et aux spectres d'émission des différentes molécules dans ce même solvant. L'analyse des données est effectuée sur la base des règles de sélection exposées dans le premier chapitre : l'absorption biphotonique est composée de deux termes majeurs ; le terme dipolaire, uniquement présent (et souvent dominant) dans les composés non-centrosymétriques aux longueurs d'onde considérées ; le terme quadripolaire, responsable des propriétés d'ADP des molécules centrosymétriques (quadripôle). La superposition ou non des longueurs d'onde d'ADP et d'AUP nous renseigne donc sur le caractère électronique dipolaire/octupolaire ou quadripolaire des molécules (et donc sur l'éventuelle apparition de rupture, transitoire ou permanente, de la centrosymétrie de la molécule sous l'effet de distorsions)

Nous allons donc nous intéresser dans un premier temps à la variation de position de la bande d'absorption d'ADP. En première approximation, on retrouve une évolution globalement similaire aux observations pour les spectres d'absorption et d'émission linéaires avec les changements de d'énergie. L'augmentation de la longueur de conjugaison provoque à nombre de bromes constants un effet bathochrome (Figure 2- 63). De la même façon, les pentamères semblent être limités en terme de conjugaison et un décalage plus important vers le rouge n'est pas observé.

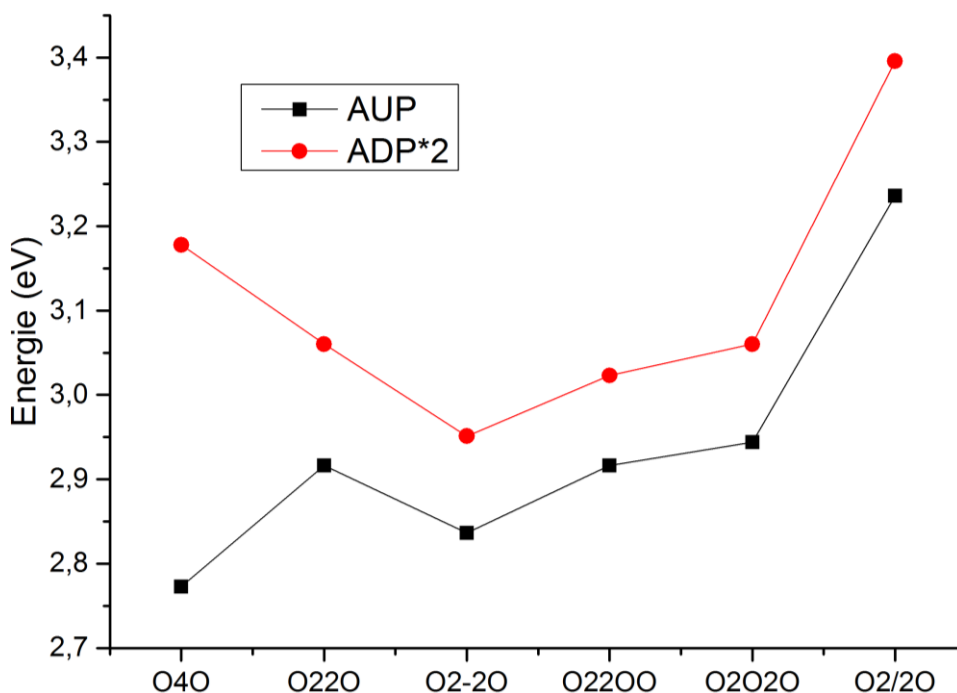


Figure 2- 63 : comparaison des énergies d'absorption à un et deux photons des composés tétra-bromés.

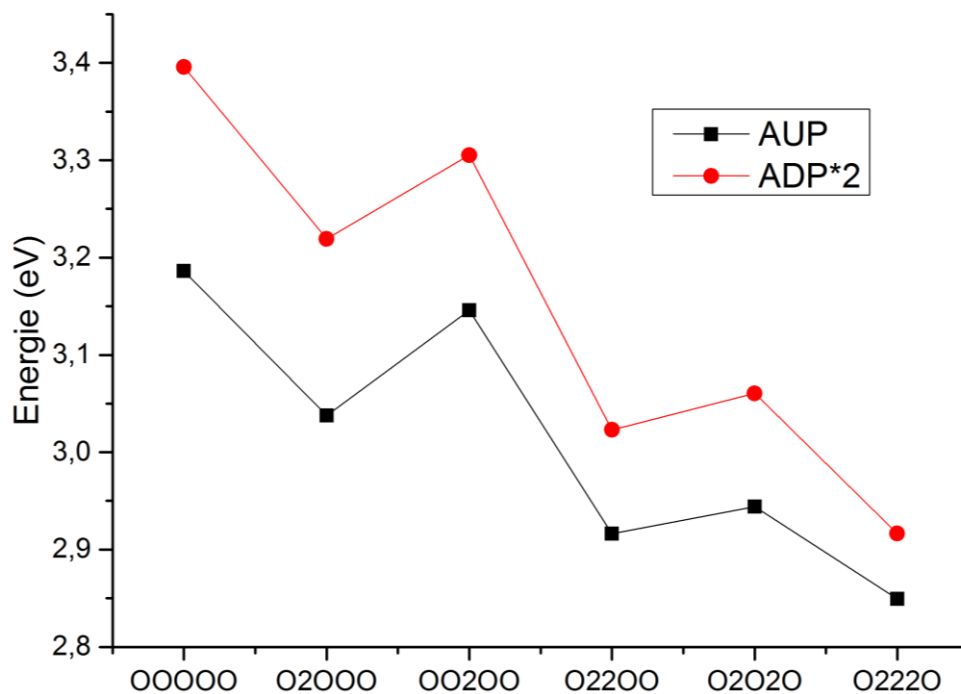


Figure 2- 64 : comparaison des énergies d'absorption à un et deux photons dans la famille des pentamères.

Un effet bathochrome similaire à celui déjà mentionné pour l'absorption linéaire est observé sous l'effet de la substitution en brome. Dans une famille donnée, l'introduction de substituants brome supplémentaires décale le spectre d'absorption à deux photons vers le rouge, et tend à faire

converger son maximum avec celui de l'absorption monophotonique. Les variations de la longueur d'onde d'ADP dans la famille des pentamères sont données Figure 2- 64.

Le bathochromisme d'absorption à deux photons est plus important (au facteur deux près) que celui à un photon. En d'autres termes, l'augmentation de conjugaison et de substitution en brome rapproche les états énergétiques accessibles à un et deux photons (que l'on peut supposer être les états S_1 et S_2).

Nous allons maintenant regarder la position des bandes d'absorption à un et deux photons. Plusieurs comportements distincts peuvent être relevés. Le composé **202** possédant une section efficace très faible et ne sera pas discuté.

La première tendance concerne la famille des octupôles. On observe une superposition des bandes d'AUP et d'ADP. Ces observations sont en accord avec les règles de sélection des molécules non-centrosymétriques (Chapitre n°1) et confirment une transitions de type dipôle.

Pour les quadripôles courts (**020** et **040**), dont l'architecture est caractéristique des molécules centrosymétrique et présente ainsi un terme quadripolaire dominant, l'absorption à deux photons n'est pas superposable à l'absorption à un photon à double longueur d'onde. Ces observations ne sont pas surprenantes au vue de la structure moléculaire.

Les autres molécules ont un caractère médian. Les bandes d'absorption à un et deux photons ne sont pas superposées. Cependant le caractère quadripolaire n'est pas aussi bien marqué.

Certains tétramères et pentamères pourtant clairement non-centrosymétriques ou centrosymétriques, comme le montre les calculs théoriques semblent présenter un caractère médian. En effet dans les familles tétramères alcyne, dyine et les pentamères, plus le nombre de brome augmente, plus on tend à superposer le spectre d'absorption linéaire et celui de l'ADP. Ainsi le composé **02220** a manifestement un caractère de dipôle. Or les composés **02000**, **02200**, **0200** et **02-00** ont un caractère moins dipolaire alors qu'ils ont une dissymétrie électronique. Cette observation pourrait être corrélée avec une torsion de la molécule qui ferait apparaître un caractère dipolaire. Ce caractère dipolaire renforce alors la bande d'ADP issue de S_1 et diminuerai la bande issue de la transition à partir de S_2 . Cependant les atomes de brome ne semblent pas apporter de modification structurale et leurs faibles caractères accepteurs ne sont pas en faveur de cette hypothèse, même si cette dernière hypothèse pourrait expliquer pourquoi les composés non-symétriques ont un caractère quadripolaire. De plus, si on regarde la famille des tétramères biphényles synthétisés pour faire apparaître une distorsion (groupe de symétrie D_{2h}), on observe

une bande quadripolaire qui tend à se rapprocher de la bande dipolaire avec la substitution de bromes. Pour cette famille, l'ADP semble suivre le même comportement que les autres tétramères. Deux explications peuvent être avancées. La première est qu'il s'agit de modes vibroniques de S_0 qui permettent l'accès à des modes de vibrations de l'état S_1 d'où l'expression du caractère dipolaire. Cette hypothèse peut être avancée car nous avons vu lors des calculs théoriques que pour ces molécules le couplage vibronique est un paramètre important pour voir une bonne description des transitions. Cette hypothèse doit cependant être confirmée par des calculs théoriques. La deuxième hypothèse est que les états S_2 et S_1 se rapprochent énergétiquement sous l'effet de l'augmentation de la conjugaison et de la présence des atomes de brome. Dans le cas limite, **02220**, l'état S_2 est proche de l'état S_1 est le caractère dipolaire observé n'est alors qu'apparent, il s'agit plutôt d'un décalage bathochrome de la composante quadripolaire de la bande d'ADP. Le tracé de la différence d'énergie des états S_2 et S_1 obtenu donne une corrélation convaincante qui tend à valider ce décalage bathochrome (Figure 2- 65).

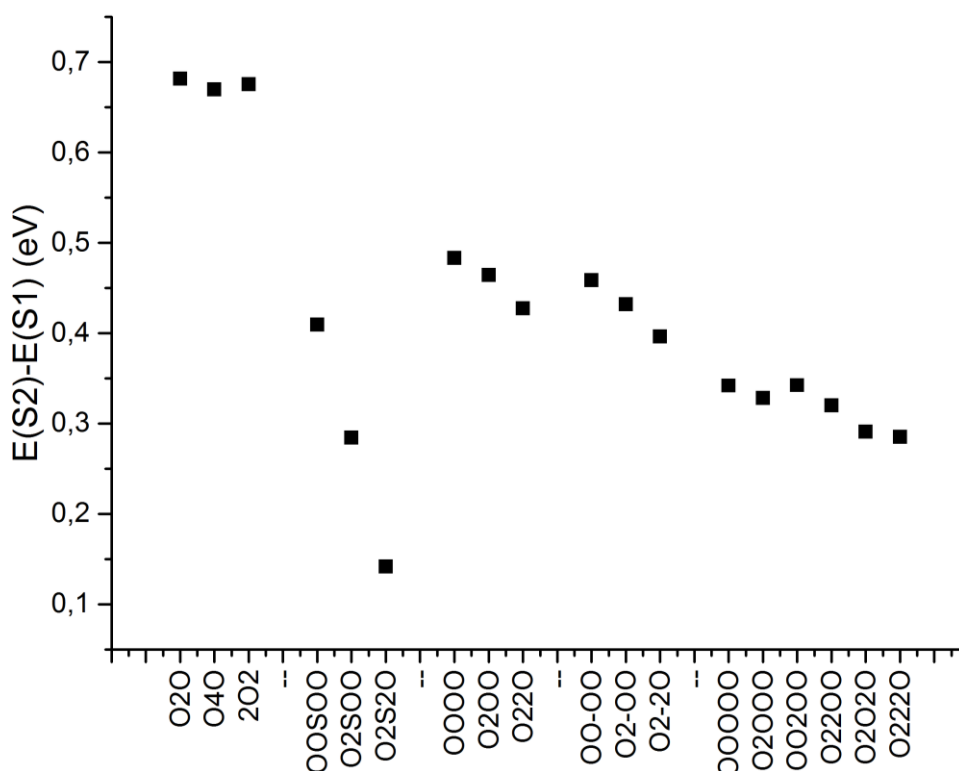


Figure 2- 65 : Evolution de l'écart énergétique S_2-S_1 dans les différentes familles de quadripôles.

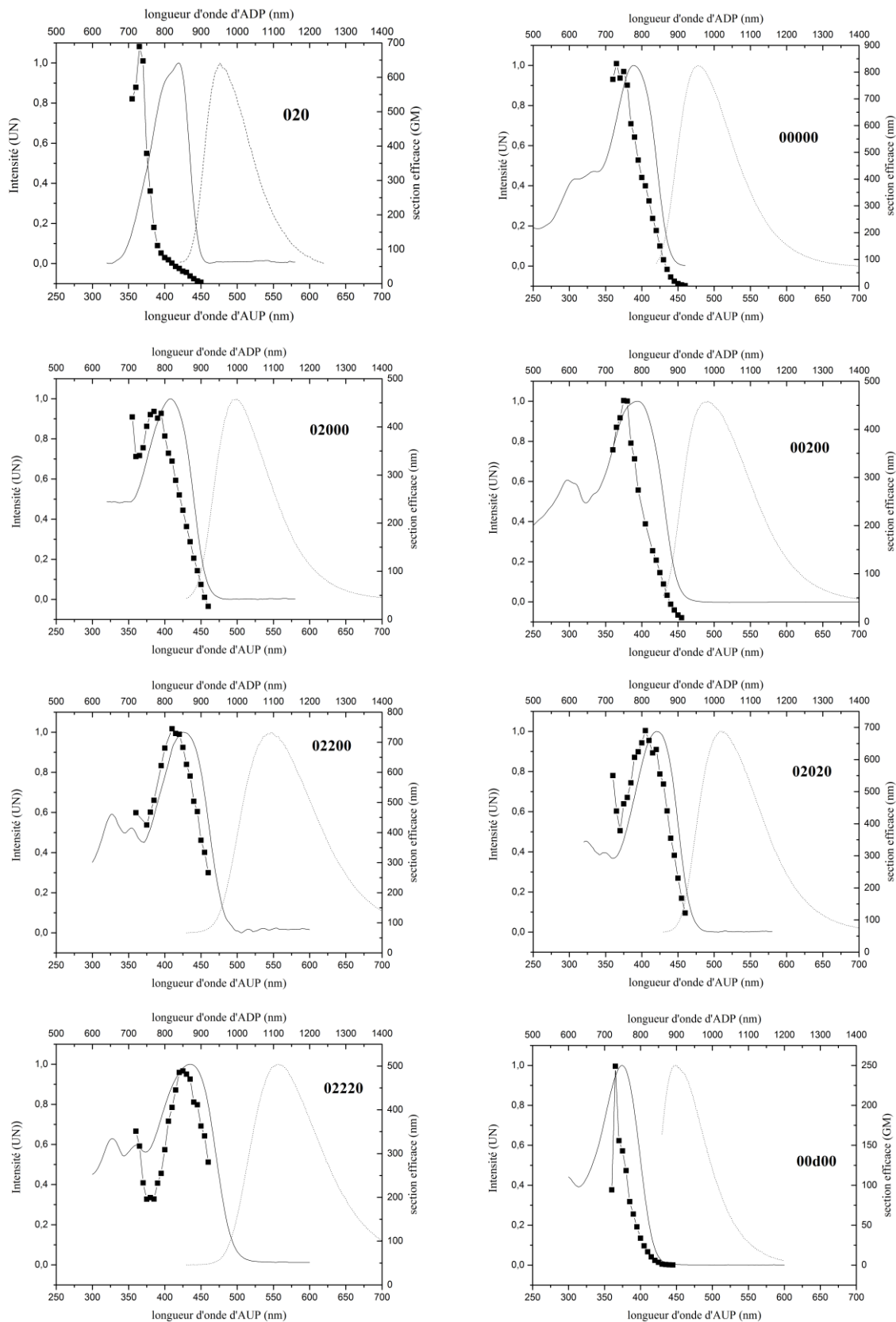


Figure 2- 66 : Spectre d'absorption à un (trait plein) et deux photons (trait plein + symbole) et spectre d'émission (pointillé).

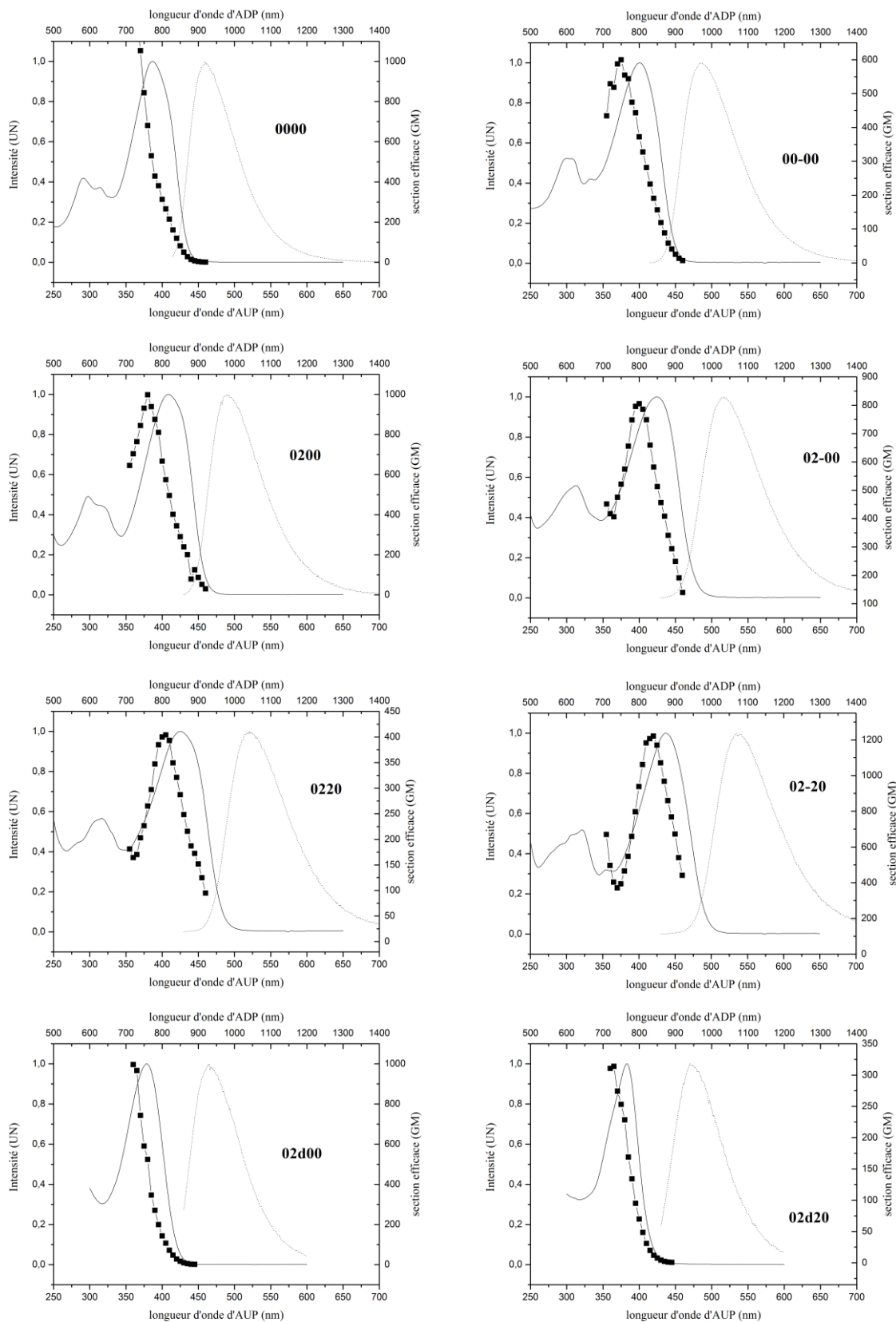


Figure 2- 67 : Spectre d'absorption à un (trait plein) et deux photons (trait plein + symbole) et spectre d'émission (pointillé).

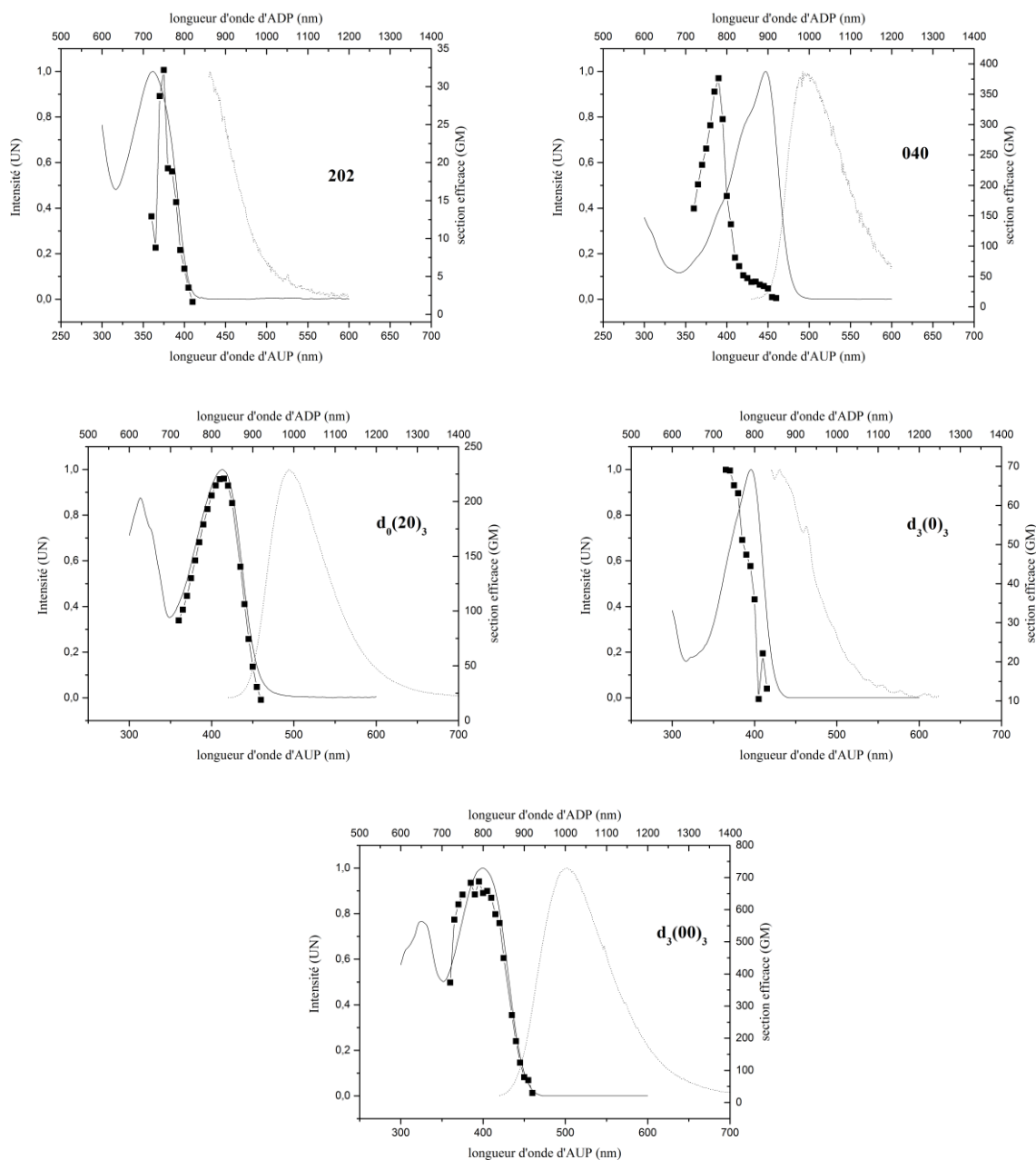


Figure 2- 68 : Spectre d'absorption à un (trait plein) et deux photons (trait plein + symbole) et spectre d'émission (pointillé). Nous allons maintenant étudier les variations intensités de la section efficace d'APD.

Les trimères **040** et **020** présentent une évolution classique. Le composé **040** présentant un caractère quadripolaire comme la référence **020** et possède une section efficace d'ADP du même ordre de grandeur que pour **020**. Le passage de deux à quatre bromes ne renforce pas le caractère accepteur du phényle central.

Les familles des tétramères à pont central alcyne et di-yne présentent des sections efficaces de l'ordre de 1000 GM. L'allongement du système conjugué permettant ainsi un meilleur transfert de charge est cohérent et permet d'expliquer l'augmentation de la valeur des sections efficaces. Dans la famille des tétramères à pont centrale di-yne la présence des atomes de bromes semblent influencer positivement sur la valeur de la section efficace (**00-00** : 600 GM, **02-00** : 800 GM, **02-20** : 1220 GM). On observe le contraire pour les tétramères à un pont alcyne (**0000** : 1450 GM, **0200** : 1000 GM, **0220** : 400 GM). Dans la famille à pont central alcyne on peut avancer le fait de l'apparition d'une torsion dû aux atomes de bromes limitent le transfert de charge ce qui n'est pas le cas pour la famille di-yne. Cependant cette hypothèse n'est pas vérifiée par les angles mesurés théoriquement. La famille des tétramères à pont central bi-phényle a une évolution différente avec une chute de la section d'ADP (240 GM pour **00/00**). Ces variations peuvent s'expliquer par la rupture de la conjugaison. Les atomes de bromes influent positivement la valeur de la section efficace avec un maximum pour la molécule **02/00** possède une section proche de la référence **020**. L'ajout de brome renforce le transfert de charge mais pour le composé **02/20** il renforce aussi les torsions limitant le transfert de charge d'où une valeur de section efficace médiane (314 GM).

Pour la famille des pentamères les valeurs des sections efficaces sont importantes et sont mesurées entre 400 et 800 GM au sein dans la fenêtre de transparence biologique, ce qui rend potentiellement ces chromophores intéressants pour des traitements PTD. De manière surprenante, la section efficace la plus large est obtenue pour le composé **00000** alors qu'il est observé pour les quadripôles de type D- π -A- π -D, que le renforcement du caractère électro-déficient de la position centrale (ici par une substitution du noyau aromatique par des bromes), permet l'accès à des sections efficaces plus élevées. L'angle de courbure α plus important pour les molécules portant des bromes (180° pour **02220**, 179° pour **00000**), et les perturbations occasionnées sur le système π -conjugué peuvent expliquer cette évolution. La position des bromes ne semble pas influencer sur la section efficace d'ADP. Les composés **00200** et **02000** ont une section efficace autour des 450 GM tout comme le dérivé **02220**. Les composés tétrasubstitués en brome (**02020**, **02200**) ont des sections efficaces voisines de 750 GM. Il n'apparaît pas ici de critère simple sur le transfert de charge permettant d'expliquer ces résultats.

Contrairement à ce qui avait été observé pour les coefficients d'extinction molaire, les composés octupolaires **O₀(20)₃** et **O₃(00)₃** ne semblent pas présenter une section efficace d'ADP significativement exaltée par rapport à leurs analogues linéaires. Pour ces composés purement

octupolaires la présence des bromes au centre ($O_3(00)_3$) permet d'exacerber le transfert de charge est d'obtenir une section d'ADP 725 GM à comparer à une section de l'ordre de 200 GM pour le dérivé $O_0(20)_3$. Le composé $O_3(0)_3$ possède une faible section efficace (70 GM). Une forte contrainte stérique au niveau du phényle central pourrait être à l'origine d'une efficacité amoindrie du transfert de charge, ce qui expliquerait ce résultat. De la même manière, le composé **202** possède une section efficace très faible ce qui est en accord avec un transfert de charge limité sur l'aniline. Pour ce dernier, il est néanmoins important de mentionner la gamme limitée (720-920nm) dues à l'utilisation d'un laser Ti-Saphir, ne permet pas d'observer le maximum de la bande d'ADP, fortement décalé vers le bleu, et donc d'apporter une conclusion formelle quant à la valeur maximale absolue de section, efficace de ce composé.

IV.4) Etudes photophysiques des états excités

IV.4.a) Lien entre la production de 1O_2 et ϕ_{CIS}

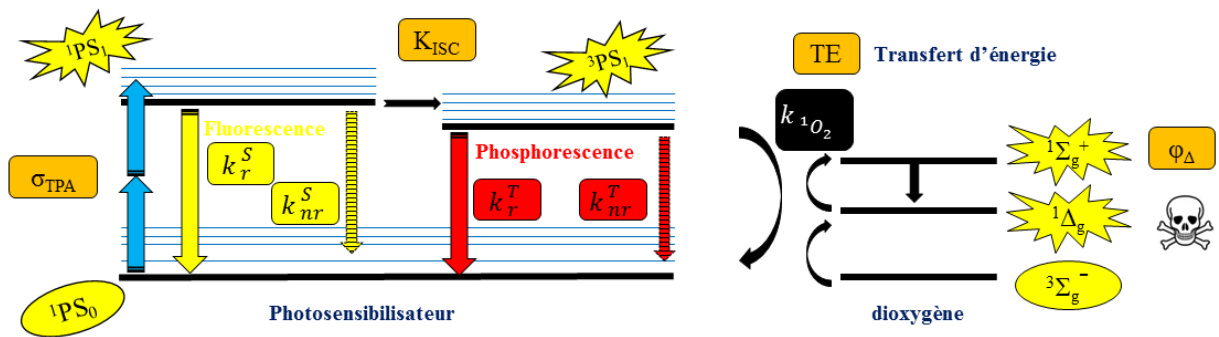


Figure 2- 69 : Constantes cinétiques dans le cadre de la PTD-ADP.

Ainsi que le traduit le diagramme de Jablonski (Figure 2- 69), le rendement quantique de fluorescence, le rendement quantique de croisement intersystème et le temps de vie de fluorescence sont reliés aux constantes cinétiques. Cette relation peut être exprimée au moyen des équations : (en prenant $k_{nr} = k_{nr}^S + k_{CIS}$ et $k_r = k_r^S$)

$$\phi_f = \frac{k_r^S}{k_r^S + k_{nr}^S + k_{CIS}} ; \tau_f = \frac{1}{k_r^S + k_{nr}^S + k_{CIS}} ; \phi_{ISC} = \frac{k_{CIS}}{k_r^S + k_{nr}^S + k_{CIS}}$$

k_{nr} la constante cinétique représentant l'ensemble des phénomènes non-radiatifs issus de S_1 ,

k_{nr}^S la constante cinétique des phénomènes non-radiatifs issus de S_1 or CIS,

k_{CIS} la constante cinétique de croisement inter-système,

k_r^S la constante cinétique de fluorescence.

Ainsi que nous l'avons déjà évoqué, pour une famille donnée, la plateforme moléculaire commune a pour but de rendre les valeurs des constantes k_r^S et k_{nr}^S aussi indépendantes que possible de la substitution en brome, ce qui devrait permettre de relier ϕ_{ISC} à ϕ_{O_2} . Cette propriété est vérifiée pour k_r^S pour les différentes familles (Figure 2- 71, Figure 2- 73 et Figure 2- 75). Cependant la donnée k_{nr} n'est pas directement accessible par nos mesures spectroscopiques et photophysiques indépendamment de k_{CIS} ; nous avons donc cherché à vérifier cette hypothèse en procédant à un raisonnement récursif. En faisant donc les hypothèses que k_r^S et k_{nr}^S sont constantes et en notant $a = k_r^S$ et $b = k_r^S + k_{nr}^S$, les équations deviennent :

$$\phi_f = \frac{a}{b + k_{CIS}} ; \tau_f = \frac{1}{b + k_{CIS}} ; \phi_{ISC} = \frac{k_{CIS}}{b + k_{CIS}}$$

Les hypothèses faites seront donc vérifiées si l'égalité suivante est vérifiée au sein de chaque famille :

$$\frac{\phi_{f(i)}}{\phi_{f(j)}} = \frac{\tau_{f(i)}}{\tau_{f(j)}}$$

Avec i,j représentants différents membres d'une même famille

Le calcul des deux termes de cette équation au sein des différentes familles ont permis d'obtenir les résultats suivants :

i_j	00000-02000	00000-00200	00000-02020	00000-02200	00000-02220
$\phi_F(i)/\phi_F(j)$	2,00	1,11	2,00	1,86	2,05
$\tau_F(i)/\tau_F(j)$	1,82	1,08	1,99	1,65	1,15
i_j	02000-02200	02000-02020	02000-02220	00200-02200	00200-02020
$\phi_F(i)/\phi_F(j)$	1,00	0,93	1,03	1,80	1,68
$\tau_F(i)/\tau_F(j)$	1,09	0,90	0,63	1,84	1,52
i_j	00200-02220	02200-02220	02020-02220		
$\phi_F(i)/\phi_F(j)$	1,03	1,03	1,10		
$\tau_F(i)/\tau_F(j)$	1,72	0,58	0,70		

Tableau 2- 13 : Combinaison (i,j) dans la famille des pentamères.

i_j	020_202	020_040	202_040	O ₀ (20) ₃ _O ₃ (0) ₃	O ₀ (20) ₃ _O ₃ (00) ₃	O ₃ (0) ₃ _O ₃ (00) ₃
$\phi_F(i)/\phi_F(j)$	2,78	2,78	1,00	16,00	0,89	0,06
$\tau_F(i)/\tau_F(j)$	8,67	1,73	0,20	4,25	2,32	0,55

Tableau 2- 14 : Combinaison (i,j) dans les différentes familles à trois phényles et dans celle des octupôles.

i _ j	0000_0200	0000_0220	0200_0220	00-00_02-00	00-00_02-20	02-00_02-20
$\varphi_F(i)/\varphi_F(j)$	2,05	2,58	1,26	2,93	2,72	0,93
$\tau_F(i)/\tau_F(j)$	1,56	1,61	1,03	1,71	1,62	0,95
i _ j	00/00_02/00	00/00_02/20	02/00_02/20			
$\varphi_F(i)/\varphi_F(j)$	2,31	5,63	2,44			
$\tau_F(i)/\tau_F(j)$	2,97	3,57	1,20			

Tableau 2- 15 : Combinaison (i,j) dans les familles des tétramères.

Dans la plupart des familles on peut noter que les hypothèses sont globalement vérifiées aux erreurs expérimentales et aux faibles variations près. Plusieurs chromophores font néanmoins exception. Ainsi que l'on pouvait s'y attendre, la molécule **202** ne peut être comparée aux autres trimères. D'autres variations importantes par rapport à l'hypothèse sont également constatées au sein des familles octupôles et tétramères à espaceurs centraux biphényles, où la présence de substituants bromés sur les deux phényles centraux semble fortement affecter les propriétés physiques de la molécule. Pour les autres familles où k_r^S et k_{nr} peuvent être considérés comme constantes, la somme $\varphi_f + \phi_{ISC}$ peut s'écrire :

$$\varphi_f + \phi_{ISC} = \frac{a + k_{CIS}}{b + k_{CIS}}$$

Un développement limité aux premiers ordres de cette équation donne :

$$\varphi_f + \phi_{ISC} = \frac{a}{b} + k_{CIS} \left[\frac{b-a}{b^2} \right] - k_{CIS}^2 \left[\frac{b-a}{b^3} \right]$$

Si on suppose que k_r et k_{nr} sont du même ordre de grandeur ce qui se traduit mathématiquement en première approximation par $\frac{a}{b} \gg \frac{b-a}{b^2}$ et $\frac{a}{b} \gg \left[\frac{b-a}{b^3} \right]$, on obtient que

$$\varphi_f + \phi_{ISC} \approx \frac{a}{b}$$

Pour chaque famille on suppose par ailleurs que l'on a pour les composés de référence non halogénés un rendement quantique de croisement inter-système ϕ_{ISC} égal à zéro. En effet, dans ces composés aucune phosphorescence ni production d'oxygène singulet ne sont observées. Cette seconde approximation permet de déterminer le rapport $\frac{a}{b}$. Ceci permet de déterminer une valeur $\varphi_f + \phi_{ISC}$ de 0,82 (**00000**) dans la famille à cinq phényles et de 0,80 (**0000**) pour les tétramères simples ou 0,79 (**00-00**) pour la famille à quatre phényles diyne. Si nos hypothèses se vérifient, on devrait donc trouver une valeur de somme $\varphi_f + \phi_{ISC}$ constante. On a pour la famille des pentamères et des tétramères simples et à espaceur di-yne les résultats suivants :

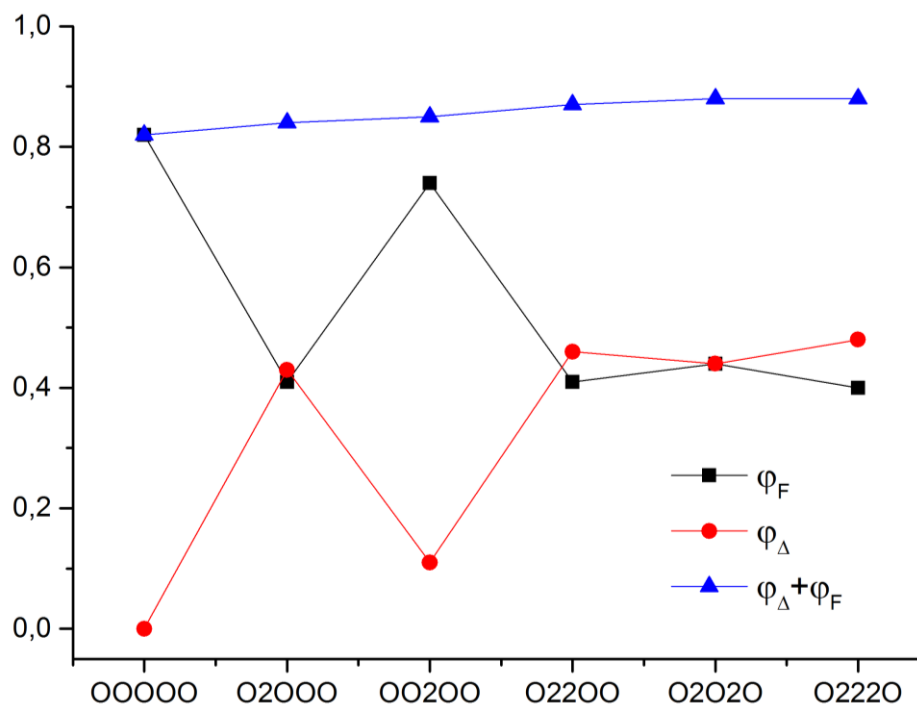
	00000	02000	00200	02200	02020	02220
$\varphi_f + \varphi_\Delta$	0,82	0,84	0,85	0,87	0,88	0,88

	0000	0200	0220	00-00	02-00	02-20
$\varphi_f + \varphi_\Delta$	0,8	0,83	0,84	0,79	0,81	0,84

Tableau 2- 16 : Evolution de la somme $\varphi_f + \varphi_{O_2}$.

Pour ces séries de composés, $\varphi_f + \varphi_{O_2}$ peut être considéré comme constante et égale au rapport $\frac{a}{b}$ et donc à $\varphi_f + \phi_{ISC}$. Ceci confirme le fait que, aux erreurs expérimentales prêt, $\varphi_{O_2} = \phi_{ISC}$. Pour ces chromophores, et dans les conditions de l'expérience (chloroforme à saturation en oxygène) la désexcitation de l'état triplet opère exclusivement par un transfert d'énergie à l'oxygène environnant, conduisant à la formation d'oxygène singulet ce qui suppose en d'autres termes k_r^T et $k_{nr}^T \ll k_{1O_2}$. La mesure de φ_{O_2} nous renseigne donc directement sur l'efficacité quantique de croisement inter-système, et nous permet de conclure quant à l'influence de la substitution en brome sur ce paramètre Ceci étant établi, nous allons maintenant nous attacher à commenter l'évolution des différents paramètres photophysiques discutés ici au sein des différentes familles.

IV.4.b) Photophysique des pentamères

Figure 2- 70 : Evolution de φ_f , φ_Δ et de leurs sommes dans la famille à cinq phényles.

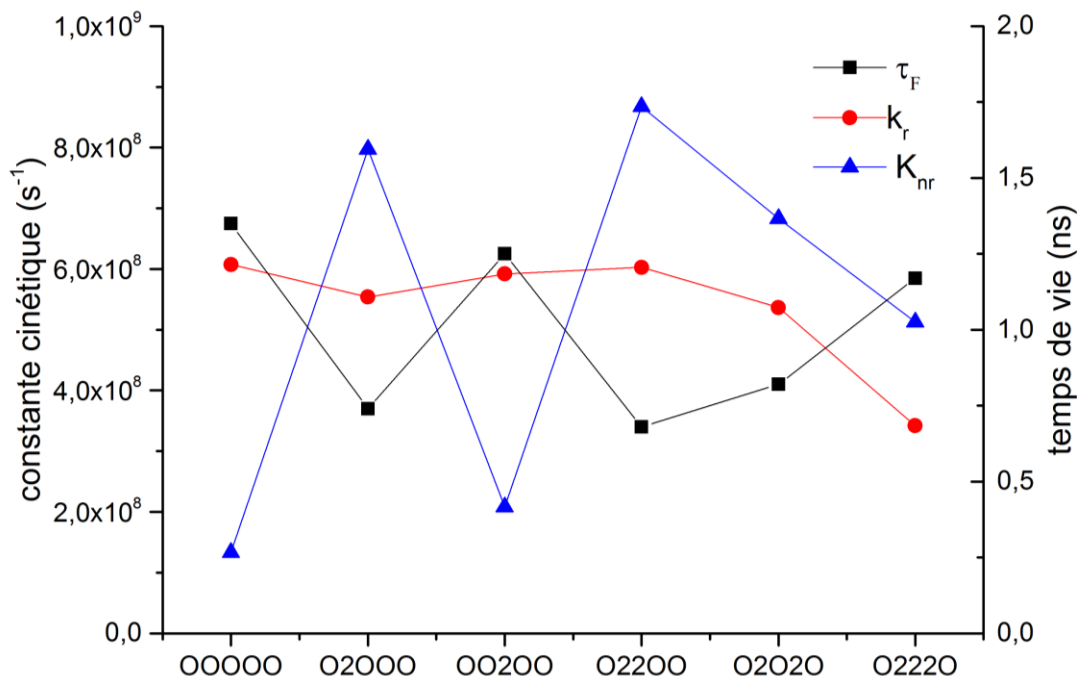


Figure 2- 71 : Evolution du temps de vie de fluorescence et des constantes cinétiques radiatives et non radiatives associées à l'état S_1 .

La famille des pentamères a été choisie comme point de départ à ce travail car elle comporte le nombre minimal de cycles phényles permettant une étude systématique de l'influence de la position et du nombre de brome sur une plateforme commune. En effet la substitution par les bromes des anilines entraîne une modification électronique importante rendant toute comparaison impossible comme nous l'avons montré au paragraphe précédent. La Figure 2- 70 montre la conservation du rendement utile autour de 85%. Les 15% restant correspondent à de la relaxation de l'état S_1 vers l'état S_0 . Le composé **00000**, pour lequel aucun croisement intersystème significatif n'est observé possède le rendement de fluorescence le plus important de cette famille. En absence de brome on vérifie qu'il n'y a pas de génération d'oxygène singulet. Dans le cadre de nos hypothèses, nous supposons qu'il y a donc un croisement inter-système nul. Les hypothèses permettent alors de corrélérer position/nombre de brome à la cinétique de croisement inter système et donc à la génération d'oxygène singulet.

L'ajout d'atome de brome va modifier la constante non radiative k_{nr} . L'augmentation de cette constante est attribuée au peuplement de l'état triplet via l'augmentation de la constante de croisement inter-système k_{CIS} (Figure 2- 71). Les conséquences sont une diminution du rendement de fluorescence compensée en point de pourcentage par l'augmentation du rendement d'oxygène singulet. La bi-substitution par de atomes de bromes, **00200** et **02000**, permet de générer

respectivement de 10% et 43% d'oxygène singlet. Pour la tétra-substitution, **02200** et **02020**, le rendement quantique $\phi_{\Delta}=45\%$. Il est de 48% pour **02220** et **02200**.

Les observations montrent que la position est le critère prédominant pour générer efficacement de l'oxygène singlet. En effet une comparaison entre les composés dibromés, montre que la position centrale est bien moins génératrice que la position latérale. L'examen des données obtenues pour les composés tétra-bromés montre que la bis substitution latérale ne change pas la valeur de génération d'oxygène singlet, en effet **02000** et **02020** ont les mêmes rendements de fluorescence et de génération d'oxygène singlet. A l'inverse la substitution centrale et latérale simultanée (**02020**, **02200** et **02220**) renforce légèrement la génération d'oxygène singlet. Cependant cette évolution est très faible et concorde avec le fait que l'introduction de substituants sur la position centrale n'a qu'un effet limité sur la constante cinétique k_{ISC} .

IV.4.c) Photophysique des tétramères

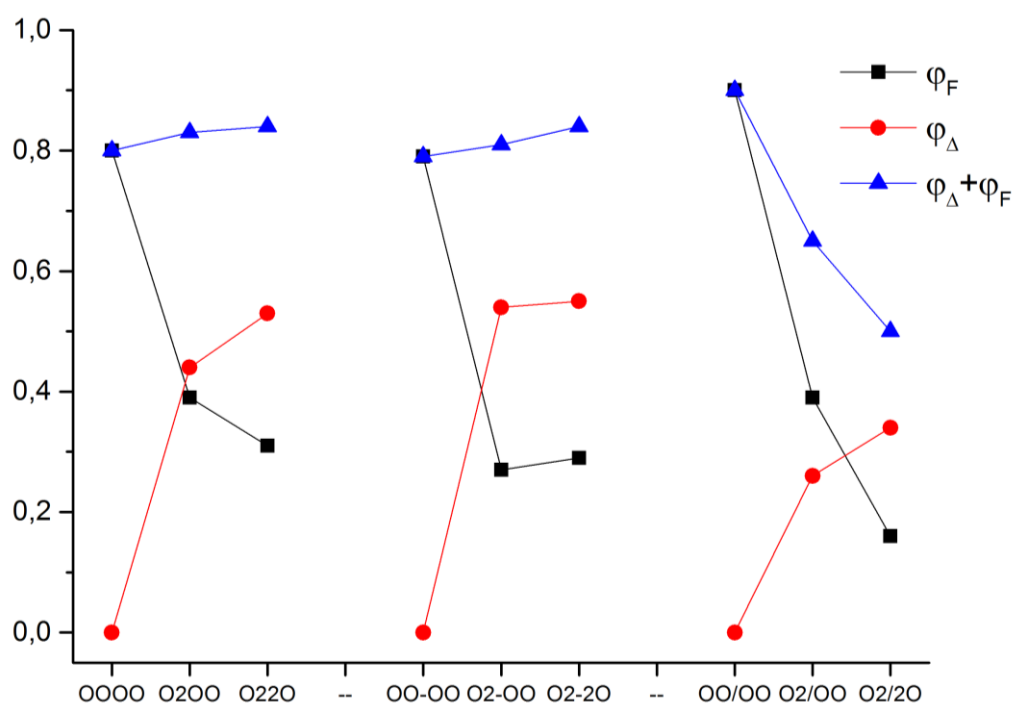


Figure 2- 72 : Evolution de ϕ_f , ϕ_{Δ} et de leurs sommes dans la famille à quatre phényles.

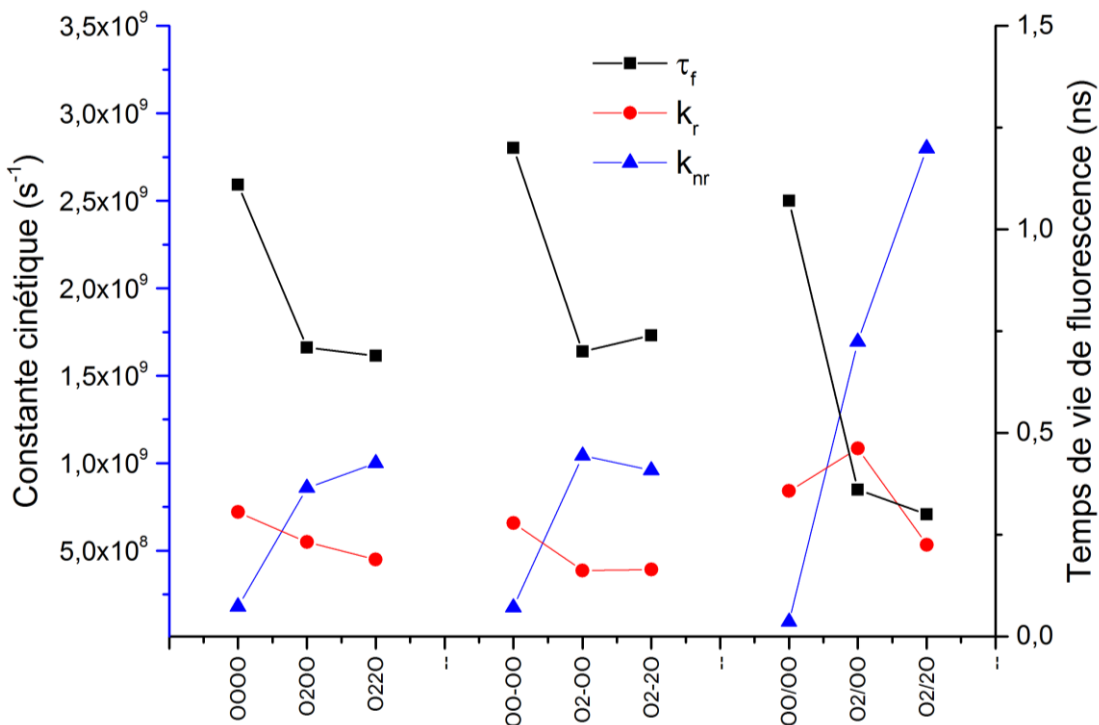


Figure 2- 73 : Evolution du temps de vie de fluorescence et des constantes cinétiques associées à l'état S_1 .

Il convient ici de distinguer deux types d'évolutions parmi les trois familles de tétramères. Dans les familles à pont central alcynes et diynes on retrouve l'évolution miroir entre les paramètres de fluorescence et la génération d'oxygène singulet. Pour ces deux familles on trouve un rendement utile constant d'environ de 83%. Là encore les hypothèses de travail sont validées et le rendement quantique de croisement inter-système peut être assimilé au rendement quantique de génération d'oxygène singulet mesuré. Les tétramères diynes montrent une évolution similaire à celle des pentamères. L'ajout de deux atomes de brome supplémentaires lors du passage du chromophore **02-00** au chromophore **02-20** ne provoque que peu de modification sur le rendement quantique de fluorescence (ϕ_A) variant respectivement de seulement 28% (54%) à 29 % (55%). Dans cette famille la position seule de la substitution semble déterminante et la bis-substitution ne semble pas renforcer la constante cinétique k_{CIS} . Dans la famille des tétramères alcynes l'ajout de deux atomes de brome supplémentaires lors du passage du chromophore **0200** au chromophore **0220** fait chuter le rendement quantique de fluorescence (augmenter ϕ_A) de 39% (44%) à 31% (53%). Contrairement à ce qui a été constaté sur l'ensemble des chromophores étudiés jusqu'ici, il semble donc que la substitution sur une position « latérale » unique ne permette pas d'atteindre une valeur optimale de croisement intersystème, et que cette optimisation requière une substitution additionnelle sur l'autre position « latérale ». L'origine de cette évolution particulière devra faire

l'objet d'études complémentaires. Les composés à base bi-phényles, à droite Figure 2- 72, montrent une toute autre évolution. La somme $\varphi_{\Delta} + \varphi_F$ n'est plus constante, et diminue à mesure que la substitution en bromes augmente. Alors que le composé **00/00** montre une efficacité de fluorescence proche de ses analogues **0000** et **00-00**, l'ajout de bromes sur la structure provoque une forte augmentation des processus non radiatifs. En d'autres termes la chute de φ_F ne se traduit pas par une augmentation dans les mêmes proportions de φ_{Δ} . L'ajout de brome entraîne une augmentation de k_{nr} ($9,4 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ pour **00/00** ; $1,7 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ pour **02/00** ; $2,8 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ pour **02/20**). Cette augmentation semble cependant trop faible pour expliquer la forte baisse constatée sur le rendement quantique de génération d'oxygène singulet : l'analogie entre les termes φ_{Δ} à ϕ_{CIS} constatée dans les autres chromophores de l'étude ne semble pas vérifiée. Deux hypothèses peuvent expliquer ces observations. L'ajout de brome peut induire des effets non-radiatifs depuis l'état triplet expliquant la baisse du rendement utile. Cette hypothèse semble mal s'accorder avec les évolutions observées sur les rendements quantiques et surtout les durées de vie de fluorescence mesurées, anormalement faibles dans le cas de **02/20**. La seconde hypothèse, plus cohérente avec les k_r et k_{nr} mesurés par fluorescence résolue dans le temps est que des effets de torsions imposés par la proximité de substituants brome font que des relaxations vibrationnelles sont prépondérantes. Ceci entraîne une augmentation de la constante cinétique de désexcitation non-radiative expliquant la baisse de rendement utile.

IV.4.d) Photophysiques des trimères et des octupôles

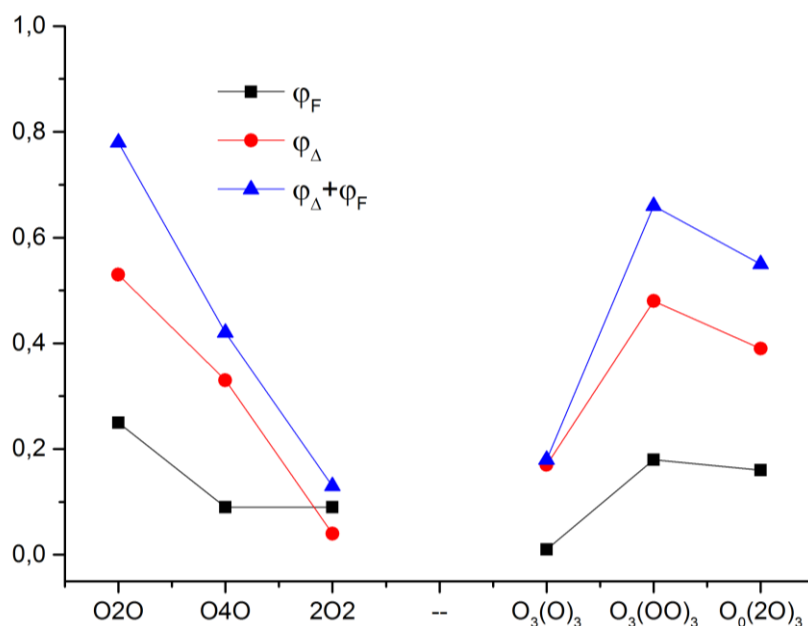


Figure 2- 74 : Evolution de φ_F , φ_{Δ} et de leurs sommes dans la famille à trois phényles et pour les dérivés octupolaires.

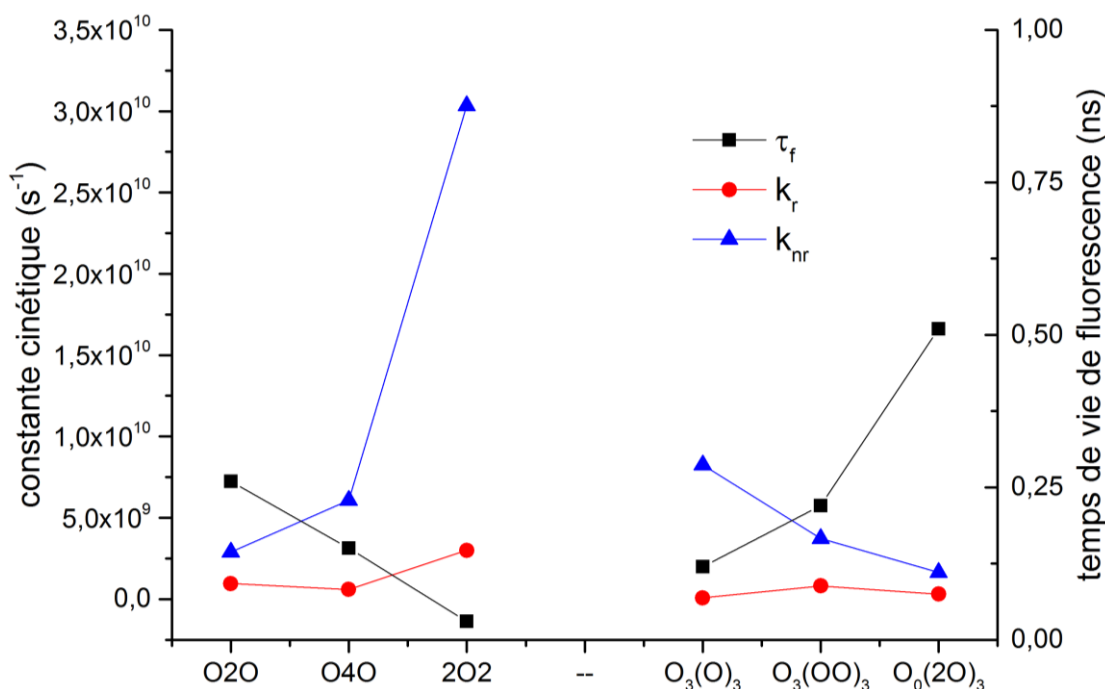


Figure 2- 75 : Evolution du temps de vie de fluorescence et des constantes cinétiques radiatives et non radiatives associées à l'état S_1 .

Le composé **202** est le plus singulier. La position des bromes sur les positions anilines est particulièrement non adaptée et une chute importante du rendement utile est observée ($\varphi_u(\mathbf{202})=0,13$). La constante k_{nr} est élevée ($3,2 \cdot 10^{-10} s^{-1}$) et reliée au transfert de charge particulièrement inefficace.

De manière générale le composé **040** et les octupôles ont des rendements utiles plus faibles que les composés dans les autres familles ($\varphi_u(\mathbf{040})=0,42$; $\varphi_u(\mathbf{O_3(0)_3})=0,18$; $\varphi_u(\mathbf{O_0(20)_3})=0,55$; $\varphi_u(\mathbf{O_3(00)_3})=0,66$). La constante k_{nr} est plus élevée pour les composés présentant le phényle central encombré (**040**, **O₃(0)₃**). Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette évolution : l'encombrement sur le phényle central qui donne lieu à des réorganisations complexes (effets vibroniques) et/ou une constante de croisement intersystème (k_{CIS}) élevée suivie d'un retour à l'état fondamental depuis l'état T_1 (k_{nr}^T élevée). Pour ces composés l'étude de la phosphorescence dans le chloroforme désaéré à température ambiante a été menée, aucune phosphorescence n'a été observée. Ce résultat est cohérent avec la contrainte stérique dans les molécules **O₃(0)₃** et **040** qui favorise les relaxations vibrationnelles d'où des constantes non radiatives élevées.

Pour les composés **O₃(00)₃** et **O₀(20)₃** l'augmentation de la longueur de conjugaison permet de retrouver un rendement utile plus important. Dans cette famille on peut voir que l'effet d'augmentation du nombre de brome n'est pas favorable à la génération d'oxygène singulet. En

effet il est plus adapté d'avoir trois bromes **O₃(00)₃** ($\varphi_{\Delta} = 48\%$) centraux que six bromes en position latérales **O₀(20)₃** ($\varphi_{\Delta} = 39\%$).

V Conclusion

Le travail d'ingénierie a permis de mettre en avant l'importance de plusieurs critères. De manière générale, l'augmentation de la longueur de conjugaison provoque une augmentation de la valeur du déplacement de Stokes. L'augmentation du nombre de brome décale à la fois la longueur d'onde d'absorption et d'émission tout en gardant un déplacement de Stokes constant. On observe alors un décalage bathochrome sur les longueurs d'onde d'absorption et d'émission. Ce décalage vers le rouge se retrouve sur les longueurs d'onde d'absorption à deux photons. Cette conséquence collatérale au travail d'ingénierie exposé dans ce chapitre, qui permet de décaler les longueurs d'ondes d'émission et d'excitation à deux photons dans la FTB, en même temps que de maximiser la section efficace va être utilisée dont le contexte de l'imagerie de fluorescence dans le chapitre suivant.

Les paramètres photophysiques sont eux uniquement dépendants de la position et du nombre de bromes. L'efficacité maximale de génération d'oxygène singulet se situe systématiquement aux alentours de 50% et ne semble pas être influencée par la longueur de la délocalisation. La substitution du squelette π conjugué par des atomes de brome sur les positions phényles latérales est à priori plus favorable que sur la position centrale pour les molécules centrosymétriques. Par rapport au positionnement de ces substituants sur le squelette conjugué, le nombre de brome n'a qu'une influence limitée sur l'efficacité de génération d'oxygène singulet, et n'apparaît donc pas comme un paramètre adéquat pour l'augmentation du croisement intersystème. Cependant cette affirmation doit être nuancée pour la famille des tétramères alcynes, dans lesquels l'augmentation de la substitution en brome conduit à une amélioration significative de la production d'oxygène singulet. En revanche, pour une raison qui reste à éclaircir, c'est la position centrale qui est favorisée dans le cas des octupôles.

Par ailleurs, l'influence d'effets stériques apparaît comme un facteur crucial, car ils peuvent engendrer des phénomènes non radiatifs importants, qui diminuent fortement le « rendement utile » des chromophores **202**, **040**, **O₃(0)₃** et tétramères biphényle.

L'ensemble des résultats d'ingénierie pourront être utilisés dans le cadre d'application PTD-ADP.

Dans ce cadre d'applications, certains composés qui possèdent une section efficace d'ADP élevée dans la FTB, une forte génération d'oxygène singulet et une fluorescence résiduelle pourront, par des modifications de la structure des anilines terminales similaires à celles exposées dans le prochain chapitre, être adaptée à des utilisations en milieu physiologique.

Même en absence de ces modifications, des essais préliminaires réalisés en cellules ont permis de montrer le caractère toxique sous irradiation d'un dérivé de la structure **02-20** (Figure 2- 76, Figure 2- 77). Un dérivé polymère permettant son hydrosolubilisation est aujourd'hui testé pour des applications en PTD-ADP *in vivo* et en microfabrication par génération d'oxygène singulet.

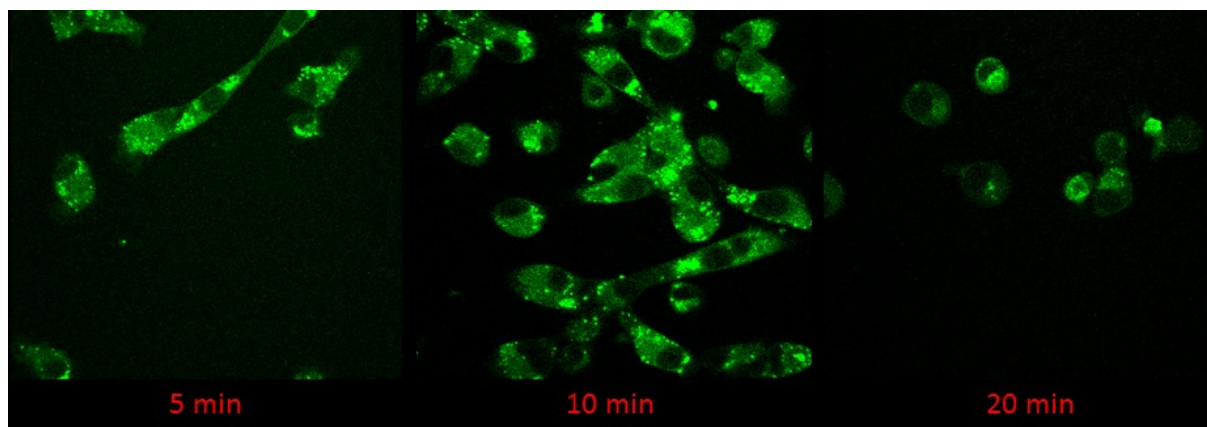


Figure 2- 76 : Effet toxique de 02-20-OAc soumis à irradiation $\lambda=435\text{nm}$, 12.9 mW/cm^2 (AUP) sur des cellules F98. La forme circulaire des cellules indiquent une phase d'apoptose en cours.

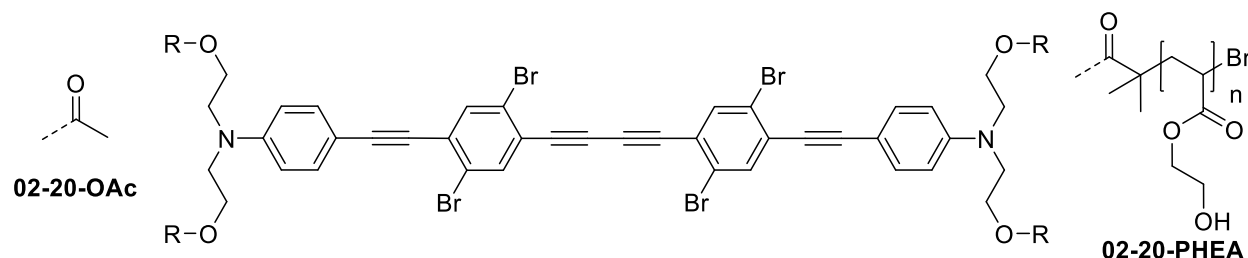


Figure 2- 77 : Structure de 02-20-OAc et 02-20-PHEA.

Chapitre n°3 : Synthèse

de nouvelles sondes

fluorescentes biphotoniques

pour l'imagerie in-vivo

Ce chapitre présente l'optimisation des sondes fluorescences à deux photons dans le cadre de l'imagerie de fluorescence intravitale. Les molécules développées pour ces applications utilisent les concepts d'ingénierie moléculaire développée au chapitre 2.

I Imagerie de fluorescence par ADP

L'ADP présente principalement deux avantages dans le cadre de la microscopie de fluorescence : la localisation au point focal qui permet à la fois une résolution améliorée, une reconstitution 3D des images acquises facilitée par rapport au mono-photonique et une absorption dans la fenêtre de transparence biologique permettant une meilleure pénétration de la lumière incidente, et donc une profondeur d'observation améliorée. En effet, un composé absorbant à 400 nm en absorption linéaire va absorber autour de 800 nm par ADP[247]. Dans ce chapitre, il sera question d'optimisation de sondes fluorescentes dans le domaine de l'angiographie intravitale[248].

I.1) Contexte de la visualisation 3D de la vascularisation cérébrale par microscopie à deux photons.

I.1.a) Etat de l'art clinique de l'étude du système vasculaire cérébral

Le sang est un milieu complexe qui permet l'approvisionnement des cellules en nutriments et en oxygène. Il est transporté par un ensemble de canaux constituant le système sanguin. Des modifications du système vasculaire peuvent induire des dysfonctionnements pouvant avoir des effets graves. Deux grands types de modifications peuvent être observés :

- les ischémies, diminution de la pression sanguine, peuvent entraîner des infarctus et des accidents vasculaires cérébraux.
- des tumeurs cancéreuses provoquant une angiogenèse dans la zone tumorale.

L'imagerie vasculaire permet d'accéder à différents paramètres que sont : le volume sanguin, le flux sanguin, la vitesse linéaire des globules rouges et la perméabilité des vaisseaux. Ces paramètres peuvent être mis à contribution dans l'établissement de diagnostics cliniques.

- Les ischémies sont repérées par la modification du flux sanguin[249].

- Les défauts d'apport en oxygène sont visualisés par l'étude de la vitesse linéaire des globules rouges qui permet de rendre compte du transport des hématies[250].
- L'observation de la perméabilité des parois des vaisseaux sanguins est réalisée par l'étude des flux sanguins au niveau de la barrière hémato encéphalique (BHE)[251]
- L'hypertension et les tumeurs cancéreuses peuvent être détectées par la mesure du volume sanguin cérébral, dont l'augmentation peut traduire des phénomènes d'hypervascularisation liés à ce type de pathologies[252].

Deux techniques cliniques d'imagerie sont à ce jour utilisées pour la visualisation du système vasculaire : l'imagerie par résonance magnétique (IRM) d'une part et l'angiographie par tomодensitométrie (CT) d'autre part[253, 254]. Dans les deux cas, il s'agit d'imageries de contraste, qui présentent l'avantage d'être non-invasives (en ce sens qu'elles ne nécessitent pas de chirurgie) et sans limite de pénétration en profondeur.

En IRM, les radiofréquences permettent un changement d'état de spin des protons de l'eau dont le signal de retour à l'équilibre, nommé relaxation, est étudié. On mesure alors deux composantes temporelles de relaxation : l'une axiale T_1 et l'autre longitudinale T_2 . Ces temps sont caractéristiques de la quantité d'eau et de l'environnement de l'organe analysé. Pour améliorer le contraste, on peut modifier localement les temps de relaxation en introduisant des agents de contraste dans le compartiment biologique d'intérêt. Ainsi, l'injection d'agent circulant dans le système vasculaire permet d'obtenir des images d'angiographie[255].

En CT, les rayons X permettent de générer un contraste en fonction de la densité du milieu traversé. Une rotation hélicoïdale permet de reconstituer une image 3D[256]. Dans ce cadre, l'agent de contraste utilisé sera un agent dit opacifiant. De tels agents possèdent des atomes dont les électrons de cœur ont des énergies d'ionisation élevées ($>10^4$ eV) comme l'iode 127, ce qui leur permet d'absorber fortement les rayons X[257].

Un inconvénient clinique majeur de ce type d'agents de contraste est leur toxicité à long terme pour le foie (toxicité hépatique) et pour le rein (toxicité néphrétique). Par ailleurs, la résolution généralement millimétrique de ces techniques ne permet pas d'observer la microvascularisation, ce qui limite leur portée dans le cadre d'études du système sanguin du cerveau. Le système vasculaire y est en effet dense, complexe et fortement ramifié par le biais de microvascularisation. Il est donc nécessaire d'utiliser une nouvelle technique possédant une meilleure résolution pour étudier la microcirculation.

I.1.b) La méthodologie TPLSFM

La détection de la microvascularisation et les modifications de cette dernière nécessitent une résolution sub-millimétrique (taille pixel environ $1\ \mu\text{m}$). Cette résolution est accessible par TPLSFM. Le schéma décrivant la TPLSFM est présenté Figure 3- 1. Les diaphragmes d'entrée et de sortie ne sont plus nécessaires contrairement à la microscopie confocale à cause de l'activation sélective au point focal du laser utilisé. La source est par contre différente, il s'agit d'un laser pulsé de forte puissance. Pour les études biologiques et précliniques, le laser Titane-Saphir déjà évoqué dans le chapitre précédent, dont la puissance maximale est obtenue vers les 800 nm, est communément utilisé. Il s'agit d'un laser pulsé femtoseconde dont la puissance crête libérée oscille entre 400 et 4000 mW. La TPLSFM permet une observation directe et en temps réel des anomalies de la microvascularisation et ainsi de comprendre les changements de contraste visualisés en analyse macroscopique par IRM (Figure 3- 2).

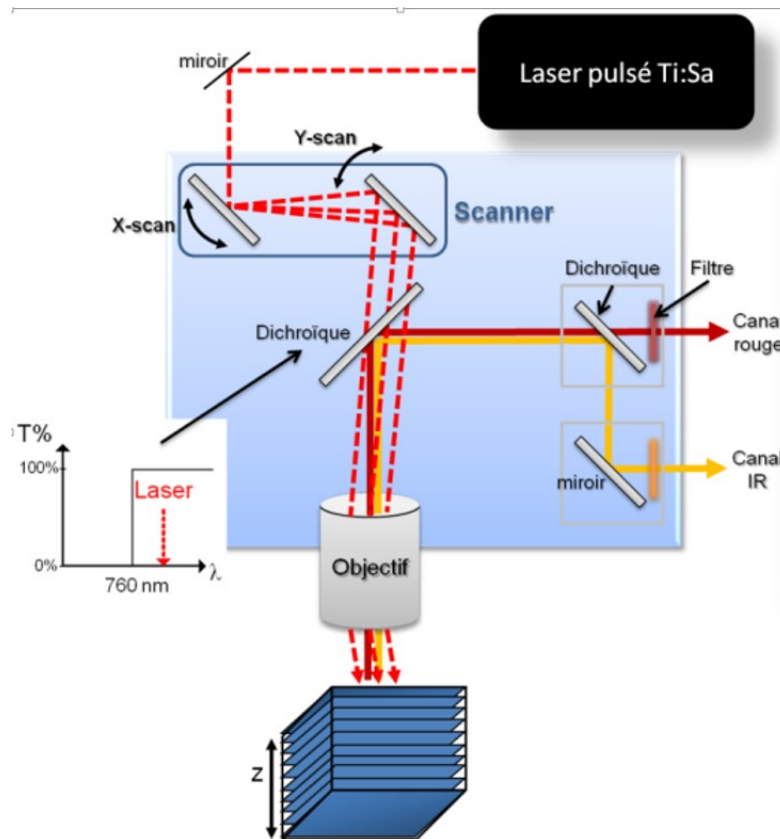


Figure 3- 1 : Schéma d'un microscope pour la TPLSFM[81].

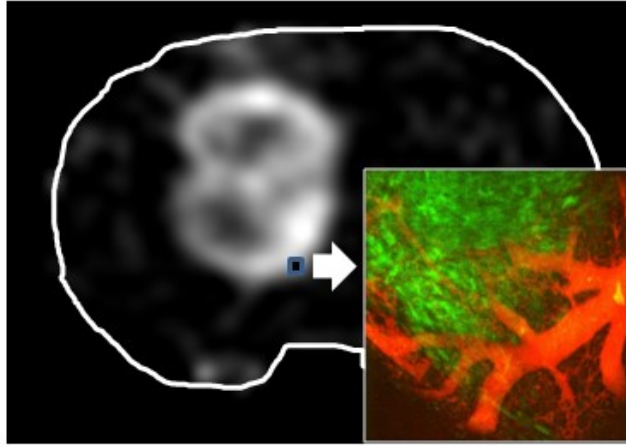


Figure 3- 2 : Comparaison de la résolution spatiale d'images acquises par IRM (en valeurs de gris) ou par microscopie à deux photons (couleur) dans un cerveau de rat porteur d'une tumeur cérébrale. A partir d'un voxel (500 x 500 x 1000 μm) d'une image IRM, l'image par microscopie biphotonique montre les détails sur la micro-vascularisation tumorale en rouge et les cellules tumorales en vert à la périphérie de la tumeur[81].

Les applications de la TPLSFM intravitale se situent à la fois dans le domaine de l'imagerie pour la recherche biomédicale (où elle constitue une alternative avantageuse à l'imagerie sur des tissus de biopsie), le diagnostic oncologique (marquage de tumeurs ou de leur vascularisation) ou encore l'assistance chirurgicale. Cette technique est particulièrement adaptée pour la visualisation du système sanguin cérébral et/ou tumoral qui nécessite d'avoir une haute résolution.

I.1.c) Avantages et limites de la TPLSFM

Dans la section-A du chapitre 1, nous avons décrit le phénomène d'ADP qui est restreint uniquement au point focal des lasers. La longueur d'onde d'absorption biphotonique décalée dans le rouge limite tout phénomène d'absorption linéaire et d'autofluorescence au sein de l'échantillon. Ces propriétés permettent d'obtenir des images de meilleures résolutions.

Dans des conditions d'imagerie *in vivo*, le choix d'un objectif compatible avec le milieu vivant impose la résolution de l'image qui est de 400nm en xy et de l'ordre du μm en axial (z) pour un grossissement *20 et une ouverture numérique de 1. Malgré les gains réalisés par la TPLSFM par rapport à la microscopie confocale, les profondeurs accessibles restent limitées. Pour permettre d'imager les organes *in vivo*, des dispositifs expérimentaux particuliers doivent être utilisés. En effet, la peau et les os des petits animaux absorbent et diffusent la lumière, ce qui limite fortement les profondeurs de pénétration. Deux grandes méthodologies existent :

- La pause de fenêtres d'observation (Figure 3- 3). Elle peut être dorsale pour faire des observations en oncologie[258], au niveau d'un organe (foie, rein)[259] ou nécessiter une

craniotomie (aussi appelée trépanation : découpe circulaire de faible diamètre aménagée dans la boîte crânienne) pour l'imagerie vasculaire cérébrale[81]. Ces fenêtres permettent de faire des études longitudinales pour suivre par exemple le développement d'une tumeur ou l'effet à long terme d'un traitement anti-cancéreux sur cette même tumeur.

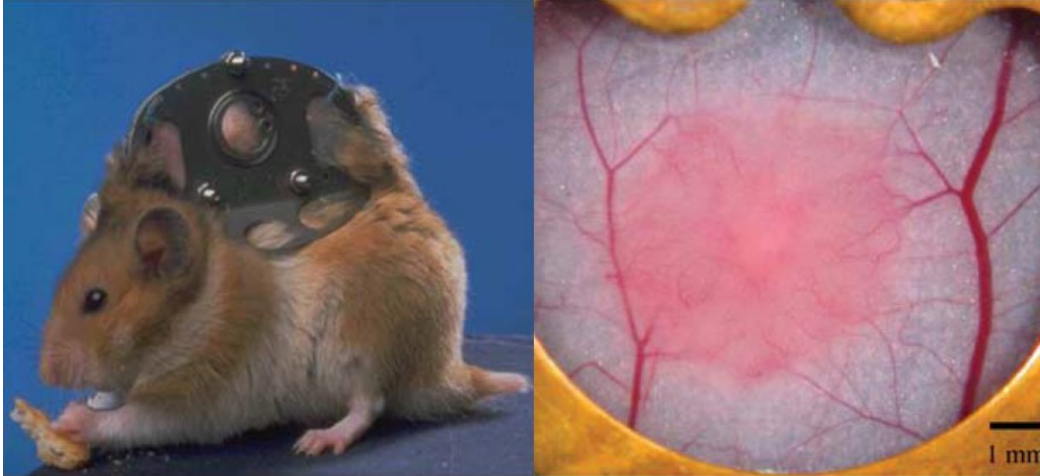


Figure 3- 3 : Exemple de fenêtre d'observation et observation de la tumeur inoculée.[258]

- Alternativement, des fibres optiques peuvent être utilisées pour guider la lumière au sein de l'organisme[178]. Il s'agit d'un développement majeur et extrêmement avantageux par rapport à la trépanation dans le cadre de futures applications cliniques. Des améliorations techniques de ces systèmes fibrés pour les adapter aux contraintes d'une imagerie biphotonique sont en cours de développement[260], et des applications *in vivo* dans le petit animal ont été récemment rapportées[261].

I.2) Les sondes pour l'imagerie de fluorescence à deux photons

I.2.a) La sonde idéale

Par analogie aux chromophores utilisés pour l'imagerie de fluorescence à un photon la sonde idéale doit à la fois posséder les caractéristiques d'une sonde fluorescente et satisfaire aux règles de l'ADP et donc avoir comme propriétés :

- rendement de fluorescence, ϕ_F , élevé,
- longueur d'onde d'émission, λ_{max}^{eme} , décalée vers la fenêtre de transparence biologique,
- longueur d'onde d'absorption à deux photons, λ_{max}^{TPA} , dans la fenêtre de transparence biologique et vers 800 nm si utilisation du laser Ti :Saphir,

- section efficace d'ADP, σ_{max}^{TPA} , la plus grande possible.

La sonde doit aussi être hydrosoluble pour pouvoir circuler dans le système vasculaire et être injectée (injection d'environ 100µL/souris à des concentrations entre 4 et 100mg/mL). La circulation de la sonde dans le flux sanguin doit avoir une durée suffisante pour permettre d'effectuer des mesures. En revanche, une fois la mesure achevée, la sonde doit pouvoir être éliminée facilement par l'organisme sans s'accumuler dans le rein, la rate et le foie via des phénomènes d'agrégation ou de précipitation[262], ni provoquer de réaction inflammatoire. Pour l'imagerie vasculaire intravital, des systèmes macromoléculaires, mieux retenus par les différentes membranes biologiques, plus hydrosolubles et moins lipophiles que ceux utilisés dans le cadre de microscopie optique de fluorescence en milieu cellulaires sont généralement utilisés.

I.2.b) Sonde commerciale pour l'imagerie vasculaire par microscopie de fluorescence

Les sondes commerciales généralement utilisées pour des applications d'imagerie intravital sont dites de première génération. Elles reprennent en effet les motifs de type rhodamine ou fluorescéine discutés en introduction. Pour permettre une utilisation in-vivo, ces dernières ont été liées de manière covalente à une molécule de dextran. Le dextran est un bio-polymère ramifié de glucose de masse moléculaire généralement voisin de 70 kDa qui procure au système résultant à la fois son hydrosolubilité, sa biocompatibilité et une durée importante de rétention dans le volume sanguin[263]. Le tableau ci-dessous donne des exemples de sondes commerciales utilisées pour de l'imagerie vasculaire.

Molécule	$\lambda_{em}(\varphi_f) / \lambda_{Abs}^{TPA}$	σ_{TPA} (GM)	Pénétration	Concentration
fluorescein-dextran[264]	520 nm (0,92 ; eau) / 800 nm	20	< 350 µm	100 µL à 100 mg/mL
rhodamineB-dextran[265]	627 nm (0,65 ; EtOH) / 840nm	210	600 µm	300 µL 100 mg/mL
DextranAlexa fluo594[262, 266]	618 nm (0,66 ; PBS) / 1000 nm	Brillance < 20 GM	~ 350 µm	200 µl/souris à 5% wt/vol
Texas Red-dextran[262]	605 (0,48 ; eau) / 1150 nm	-	~ 350 µm	200 µl/souris à 5% wt/vol

Tableau 3- 1 : Exemples de sonde pour la microscopie intravital, σ_{TPA} mesuré pour le chromophore seul.

Du fait de faibles valeurs de section efficace d'absorption à deux photons et de longueurs d'onde de luminescence souvent écartées de la FTB (sauf dans le cas de la rhodamine B), ces molécules présentent des valeurs limitées en pénétration et nécessitent des concentrations élevées en agent de contraste (typiquement supérieures à 10 mg/mL). Un travail de développement des sondes a été entrepris pour améliorer l'imagerie vasculaire cérébrale et faire des études permettant le suivi de l'évolution du système sanguin cérébral[267].

I.2.c) Les sondes de nouvelles génération pour l'imagerie vasculaire

I.2.c.i) Sondes inorganiques

L'utilisation de Quantum Dots (QDs) est une alternative pour l'imagerie profonde de fluorescence à deux photons[268-271]. Les QDs peuvent être utilisés pour visualiser, par microscopie intravitale à deux photons, la vascularisation (Figure 3- 4)[93, 262] ainsi que les tumeurs[111] dans lesquelles ils s'accumulent préférentiellement[111]. Néanmoins, la forte toxicité généralement observée de ce type de matériau [272] et la méconnaissance des mécanismes de métabolisation par l'organisme[273] sont un frein important pour des développements cliniques à court terme, malgré des améliorations significatives liées à l'utilisation de nouveaux surfactants[274].

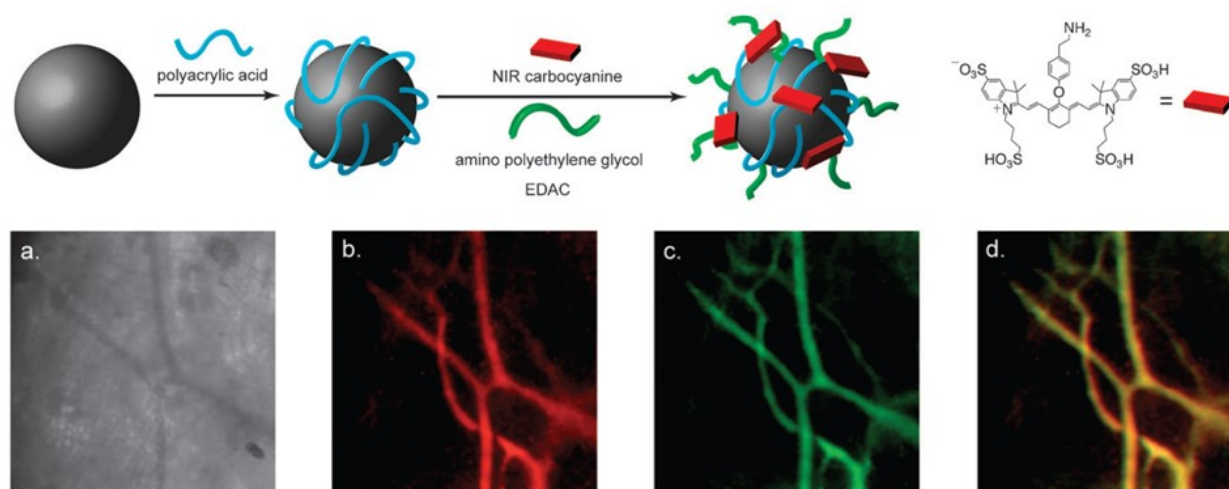


Figure 3- 4 : Haut : exemple d'une nanoparticule de Y_2O_3 décoré de surfactants (poly acide acrylique et poly éthylène glycol) et de cyanine. Bas : vaisseau sanguin d'une oreille de souris a) image en lumière bleu, b) upconversion des nanoparticules, c) fluorescence cyanine, d) superposition de b+c.

I.2.c.ii) Sondes organiques

L'utilisation de fluorophores biphotoniques organiques en milieu intravital requiert l'hydrosolubilisation préalable de la molécule à des concentrations élevées.

La première preuve de concept a été apportée dans le cadre d'études angiographiques par l'équipe de Blanchard-Desce avec un chromophore fonctionnalisé par des bras hydrosolubilisants dendritiques[275]. D'un point de vue spectroscopique, toutefois, la section efficace des chromophores utilisés restait limitée (100 GM) et la longueur d'onde d'émission se trouvait significativement en dehors de la fenêtre de transparence biologique ($\lambda_{em} = 470$ nm). De plus, la stratégie d'hydrosolubilisation, basée sur une approche dendritique nécessitant une synthèse multi-étapes complexe, est difficile à mettre en œuvre sur des échelles compatibles avec une utilisation clinique.

Une autre approche, développée conjointement par les équipes de Marder, Stéphan et Van der Sanden, consiste à emprisonner des colorants présentant une fluorescence induite par l'agrégation au sein de systèmes micellaires de pluronic® (surfactant)[276, 277]. Le chromophore sous forme d'agrégat possède une fluorescence vers 580 nm ainsi qu'une valeur de section efficace de 1000 GM dans le chloroforme. Cette méthode permet d'imager à une profondeur de 600 μ m le cerveau d'une souris avec craniotomie (Figure 3- 5).

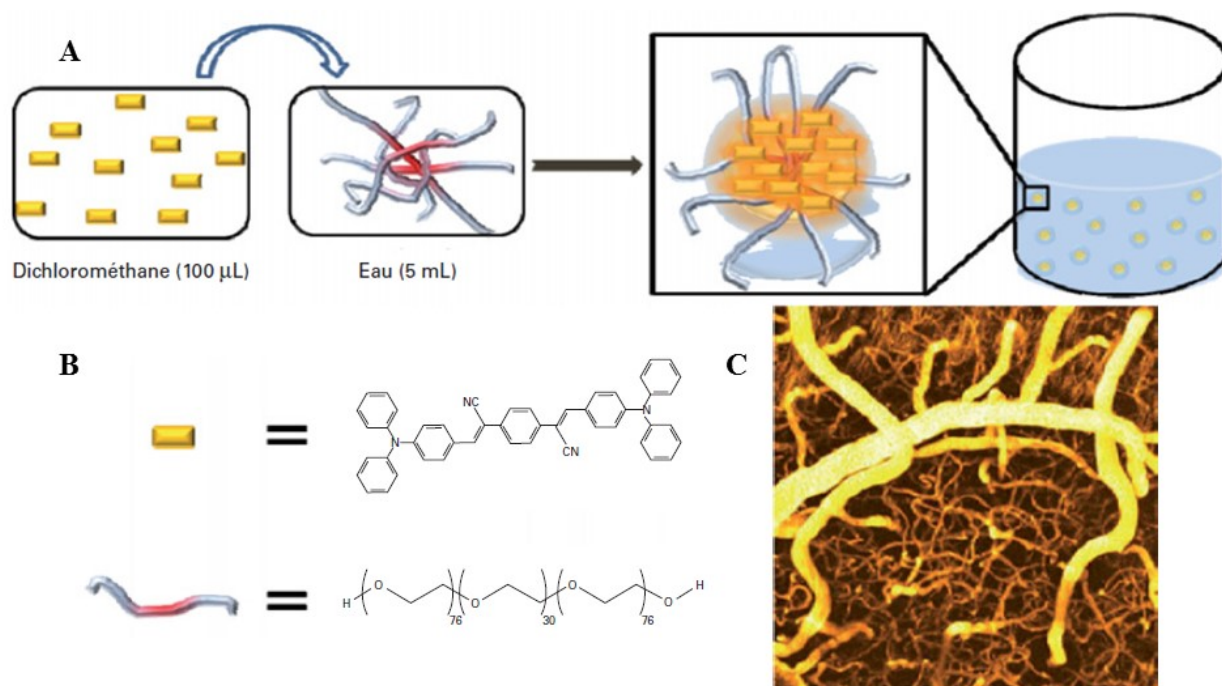


Figure 3- 5 : a) méthode de formation de micelles, b) structure du chromophore et du pluronic®, c) image de vascularisation cérébrale du cerveau de souris réalisé avec craniotomie[81].

Une approche dérivée consiste à lier de manière covalente une chaîne polymère et un chromophore absorbant à deux-photons, comme c'est le cas avec le Dextran.

I.3) Conception de nouvelles sondes au laboratoire de Chimie de l'ENS de Lyon

Avant le début de ma thèse, Cyrille Monnereau dans le groupe de Chantal Andraud a développé une méthode permettant d'hydro-solubiliser des chromophores purement organiques *via* l'introduction de chaînes polymères liées de manière covalente aux chromophores. Différentes preuves de concept ont validé la pertinence de l'approche dans l'étude de cellules en microscopie (**0A0-PHEA**), en photothérapie dynamique (**DBB-PHEA**) et pour l'angiographie de fluorescence *in vivo* (**Lem-PHEA**) à deux photons (Figure 3- 6)[52, 224]. Les propriétés spectroscopiques de ces chromophores sont regroupés Tableau 3- 2. C'est pour cette dernière application que les résultats les plus prometteurs ont été obtenus, les chaînes polymères permettant l'injection intra veineuse du chromophore en solution physiologique concentrée, la circulation du chromophore dans l'organisme sans toxicité aiguë et son élimination par les reins. Des images de vascularisation sanguine à des profondeurs supérieures à 600 μm ont été obtenues grâce à la forte luminescence de **Lem-PHEA** dans le rouge proche infra-rouge. Le faible temps de résidence de ce chromophore dans le système vasculaire, s'il constitue un point positif du point de vue de la toxicité, en constitue néanmoins la principale limitation : après deux heures, le colorant est en effet entièrement éliminé de l'organisme.

Produit	$\lambda_{max}^{OPA}(\text{nm})$	$\lambda_{max}^{em}(\text{nm})$	φ_f	$\sigma_{TPA}(\text{GM})$	$f(\text{GM})$
DBB-PHEA	390	484	0,22	398	88
Ant-PHEA	482	575	0,62	384	238
Lem-PHEA	510	676	0,22	440	97

Tableau 3- 2 : Données spectroscopiques de DDB-PHEA, Ant-PHE et Lem-PHEA dans l'eau.

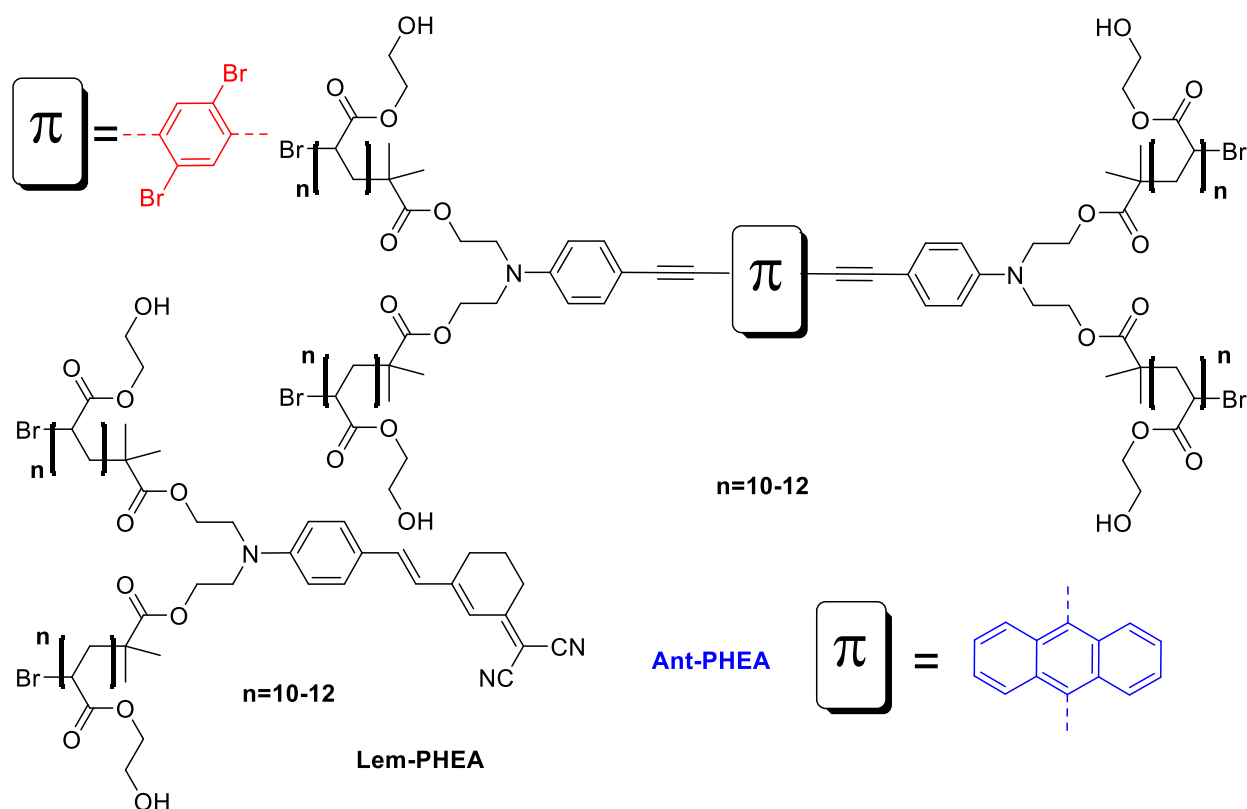


Figure 3- 6 : Exemple de chromophore pour l'ADP développé au laboratoire.

II Design de nouveaux chromophores pour l'imagerie cérébrale

II.1) Conception de nouveaux chromophores

Dans ce cadre, nous avons cherché à obtenir de nouvelles sondes présentant des propriétés de circulation optimisée pour faire de l'angiographie intravitale. Nous avons vu dans le chapitre 2 que l'insertion d'une liaison dyine au centre d'un chromophore permet de décaler sa longueur d'onde d'émission vers le rouge avec un fort accroissement du déplacement de Stokes, principalement du fait de phénomènes de distorsion du chromophore à son état fondamental[65]. Cette distorsion s'accompagne d'un décalage du spectre d'absorption à deux photons vers la FTB (Figure 3- 7). Ces deux effets cumulés rendent les chromophores développés suivant cette approche particulièrement intéressants dans un contexte de microscopie par fluorescence induite à deux photons. De plus, l'augmentation de la conjugaison permet aussi de profiter d'une augmentation de la section efficace d'absorption à deux photons pour les composés quadripolaires.

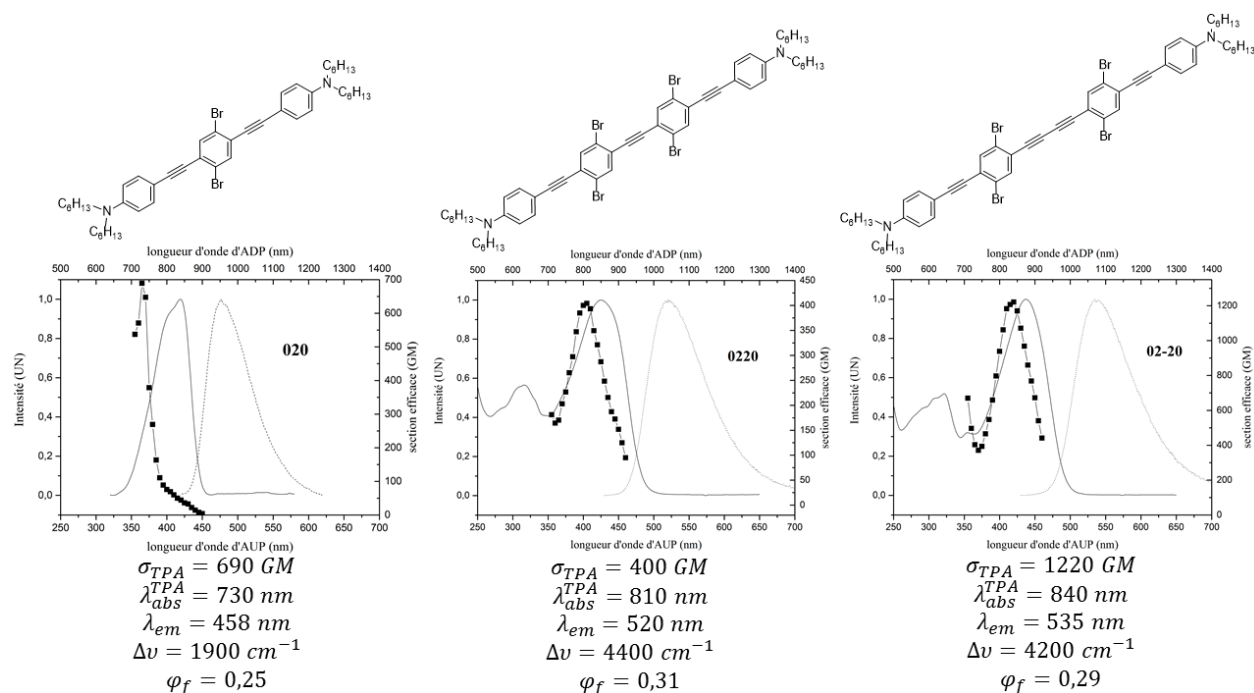


Figure 3- 7 : Résultats d'ingénierie moléculaire sur les dérivés poly-bromés.

Il a été décidé de mettre à profit cette stratégie, en substituant le groupement dibromo-benzène (utilisé pour optimiser le processus de CIS) par des groupements permettant de maximiser le rendement quantique de fluorescence. Des groupements de type phényle, fluorène et anthracène ont ainsi été étudiés (Figure 3- 8), avec pour objectif d'appliquer aux chromophores synthétisés par cette approche la stratégie d'hydrosolubilisation décrite plus haut. Dans tous les cas, en plus du chromophore diyne (analogue à **02-20**), les versions « monoyne » (analogue à **0220**) et trimères (analogue à **020**) ont également été synthétisés et soumises à une étude spectroscopique, afin de valider notre modèle sur une gamme de chromophores aussi large que possible. L'augmentation de la taille du chromophore en utilisant une même longueur de chaîne polymère doit par ailleurs permettre d'en augmenter le temps de circulation.

II.2) Nomenclature

De manière similaire au chapitre 2, une nomenclature simplifiée va être utilisée. Le cœur des chromophores phényle sera représenté par la lettre **P**, celui des fluorènes par la lettre **F** et celui des anthracènes par la lettre **A**. Les groupements diéthanol aniline latéraux sont symbolisés par le chiffre 0. Si les fonctions alcools sont substituées, le nom du substituant est ajouté après le nom du cœur du chromophore espacé par un tiret. Le substituant acétate est noté « OAc », l'alcool « OH ».

l'initiateur de polymérisation 2-bromo-2-méthylpropionyl « In » et la chaîne polymère de poly-hydroxy-éthyle acrylate « PHEA ».

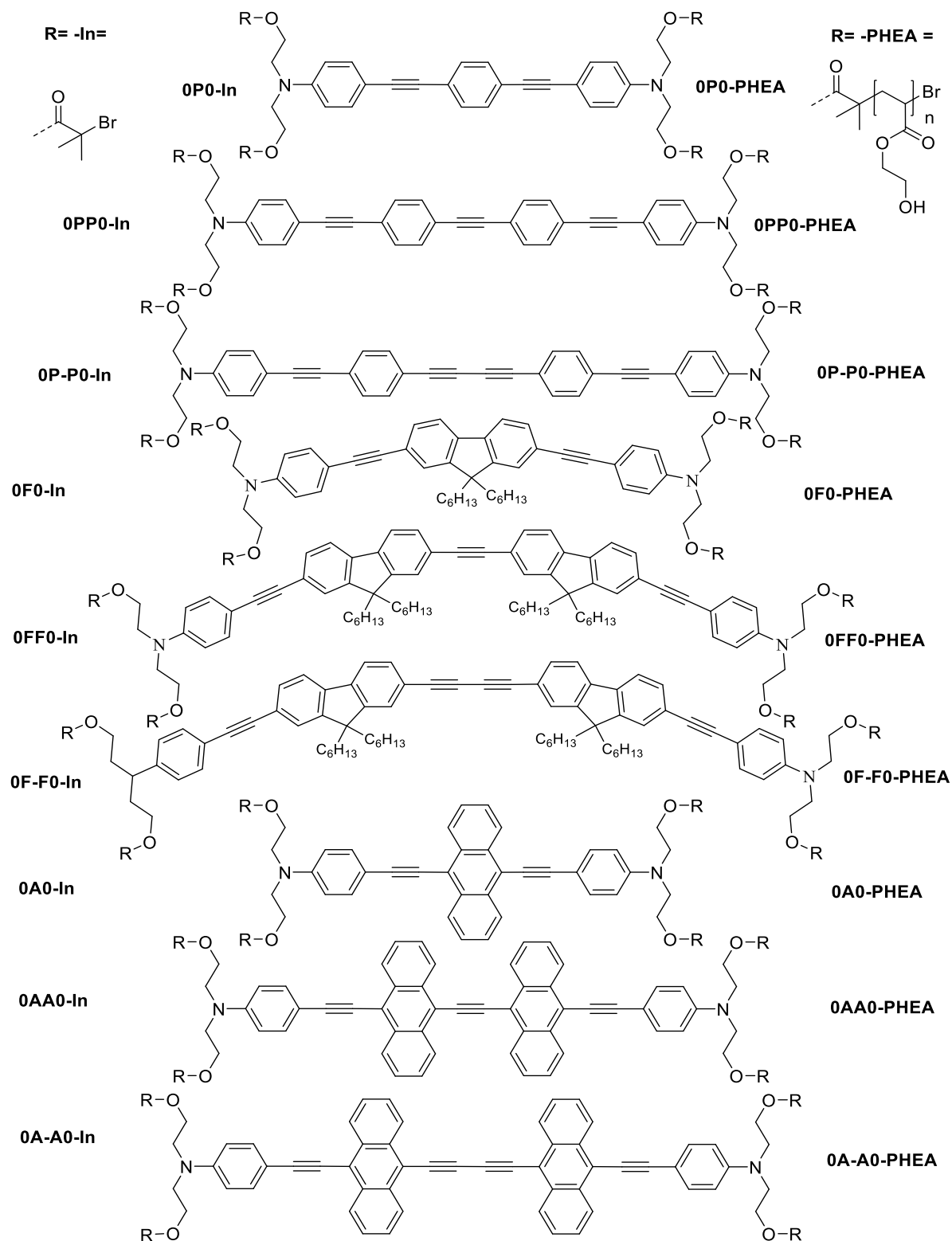


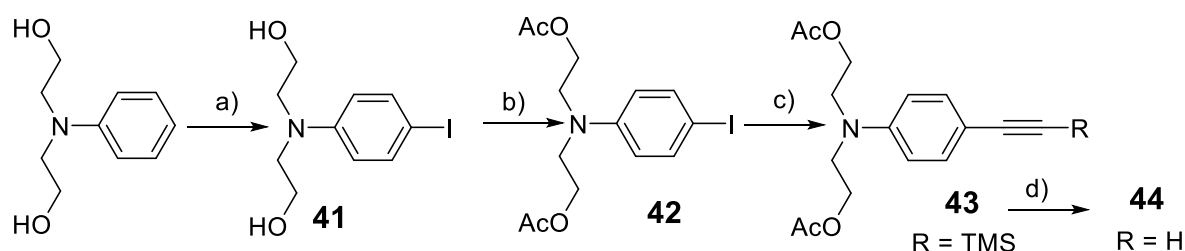
Figure 3- 8 : Structures des précurseurs de polymérisation et des polymères ciblés.

II.3) Synthèse des chromophores

Dans un premier temps, seuls les chromophores sous forme OAc ont été synthétisés afin d'étudier leurs propriétés spectroscopiques. Seules les molécules présentant des propriétés intéressantes seront par la suite transformées sous forme polymère.

II.3.a) Précurseur

La synthèse de l'ensemble des molécules de cette étude nécessite comme point de départ la N,N-di-(hydroxyéthyle)aniline dont l'iodation permet d'introduire la fonction alcyne. L'introduction de groupements acétate sur les fonctions alcools est réalisée pour augmenter la solubilité (Figure 3-9)[236, 278].

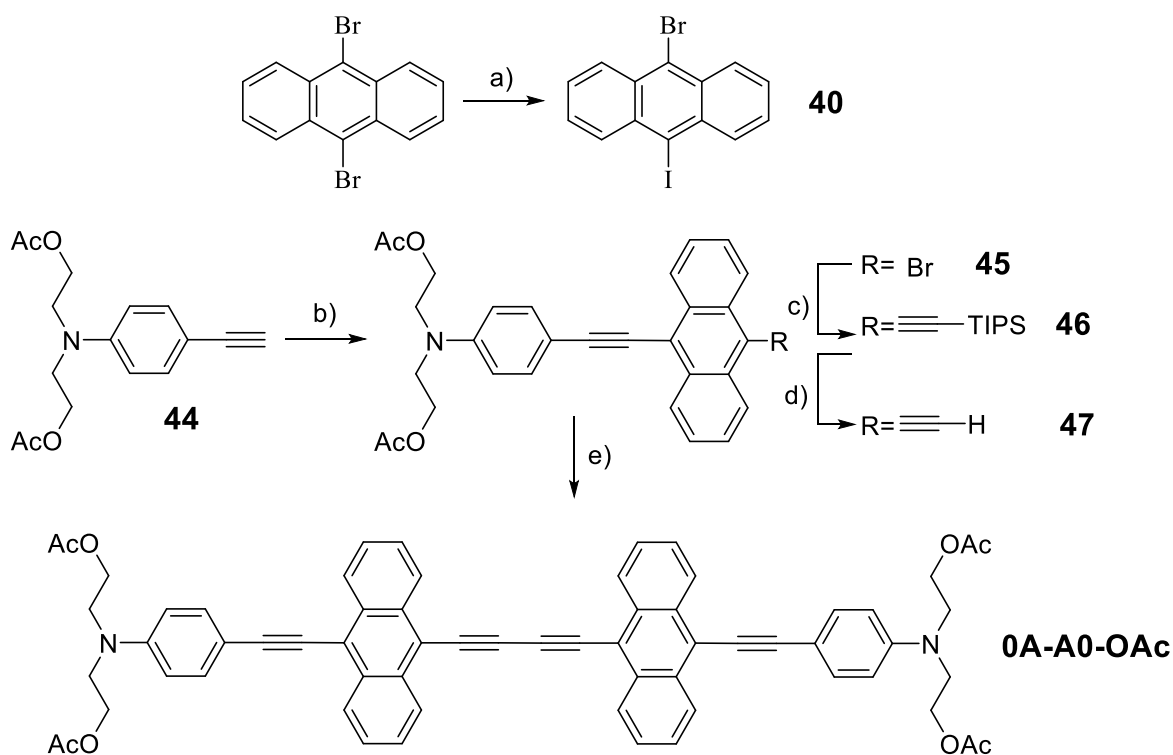


a) I_2 , THF/Pyridine, TA ; b) Ac_2O , Pyridine, TA ; c) Trimethylsilylacetylene, THF/ Et_3N , $PdCl_2(PPh_3)_2/CuI$, TA ; d) TBAF (1M) dans THF, Et_2O , TA

Figure 3- 9 : Synthèse du précurseur de la N,N-di-(hydroxyéthyle)aniline.

II.3.b) Famille anthracène

La synthèse de **0A0-OAc** est réalisée sur le di-bromo anthracène (voir chapitre n°4)[224]. La synthèse de **0A-A0-OAc** et de **0AA0-OAc** nécessite une étape clé commune pour obtenir un anthracène asymétrique substitué en position 1 et 10 par le donneur aniline d'une part et la triple liaison protégée d'autre part. L'intermédiaire asymétrique est obtenu en partant du di-bromo anthracène traité par du n-BuLi et du diode (rendement de la réaction : 79%)[279]. La synthèse du fragment clé **5** est obtenue par une succession de deux couplages de Sonogashira (Figure 3- 10). Dans le cas de la molécule **0A-A0-OAc**, l'alcyne **6** est couplé via une réaction de Gläser. Pour la synthèse de **0AA0-OAc** afin éviter la réaction de couplage de Gläser lors de la réaction entre **6** et **4** qui conduirait à avoir comme sous-produit **0A-A0-OAc**, l'iodo-bromo-antracène est mis à réagir avec **6**. Le produit obtenu est alors mis à réagir avec l'alcyne pour obtenir **0AA0-OAc**. Il est séparé du produit d'homocouplage de Gläser issu de **3** par précipitation dans le pentane (Figure 3- 11).



a) BuLi, -78°C puis I₂ 12h TA b) **40**, Toluene/Et₃N, PdCl₂(PPh₃)₂/CuI, 40°C, 73% ; c) TMSA, THF/Et₃N, PdCl₂(PPh₃)₂/CuI, 80°C, 99% ; d) TBAF (1M) dans THF, Et₂O, TA, 96% ; e) CuI, THF/Et₃N, TA, 80%.

Figure 3- 10 : Schéma de synthèse de **0A-A0-OAc**.

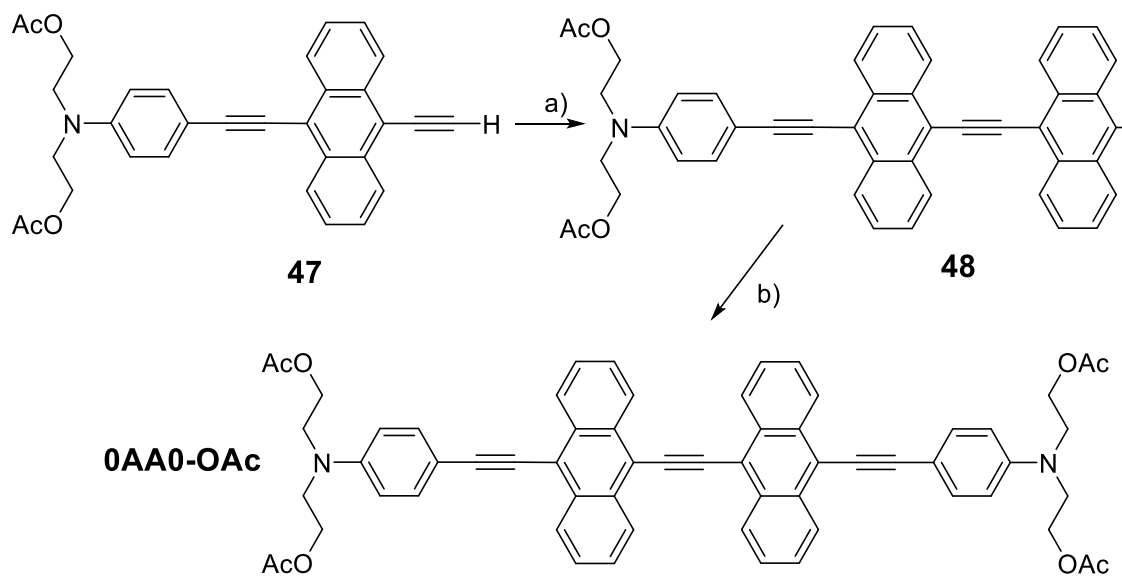


Figure 3- 11 : Schéma de synthèse de **0AA0-OAc**.

II.3.c) Famille des phényles

La synthèse de cette famille repose sur une stratégie analogue, l'étape clé de désymétrisation se déroulant par couplages de Sonogashira successifs sur l'iodo-bromo-phényle (Figure 3- 12). Le composé **0P-P0-OAc** est obtenu par couplage de Gläser de l'alcyne **52**

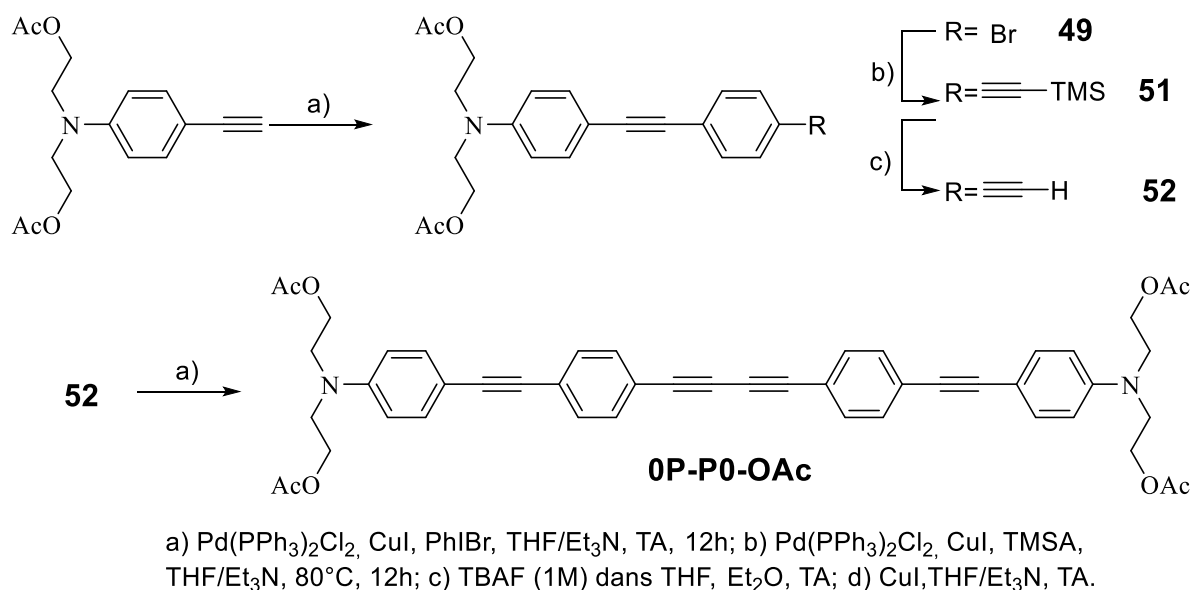
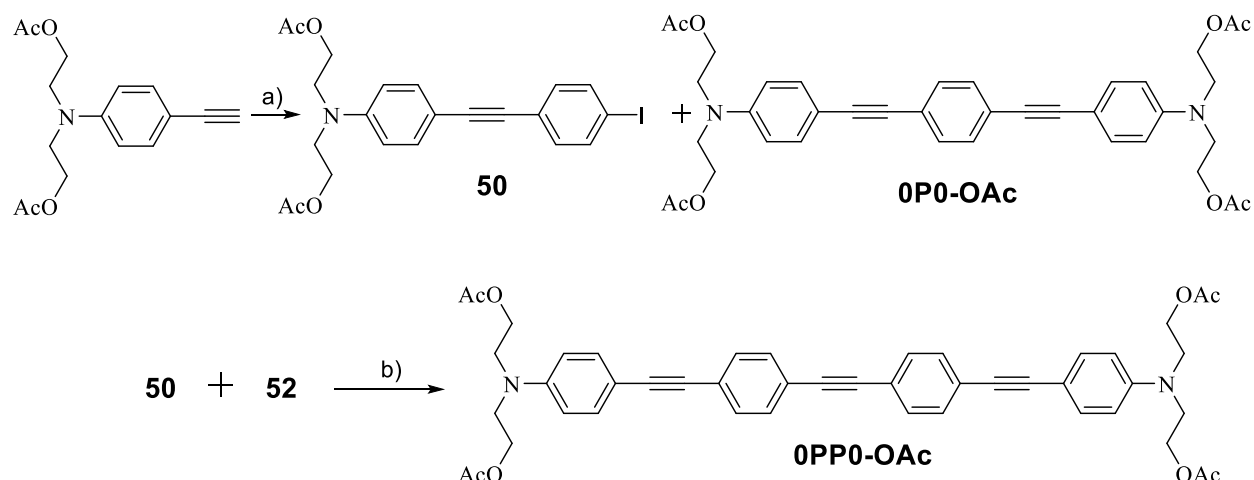


Figure 3- 12 : Voie de synthèse de **0P-P0-OAc**.

Pour obtenir le dérivé **0PP0-OAc**, le premier couplage de Sonogashira est réalisé sur le di-iodophényle (Figure 3- 13). Le produit non symétrique est obtenu avec un rendement plus faible que si on utilise le iodo-bromobenzène mais présente deux avantages :

- Le produit secondaire obtenu correspond au composé **0P0-OAc** permettant de compléter la famille et de pouvoir étudier ses propriétés spectroscopiques.
- Le produit iodé par comparaison au produit bromé permet de limiter fortement la réaction d'homocouplage à l'étape suivante. En effet, à haute température la réaction de couplage de Gläser semble favorisée par rapport au couplage de Sonogashira.

Les molécules sont obtenues respectivement avec des rendements de 40% (**0P0-OAc**) et 20 % (**0PP0-OAc**).

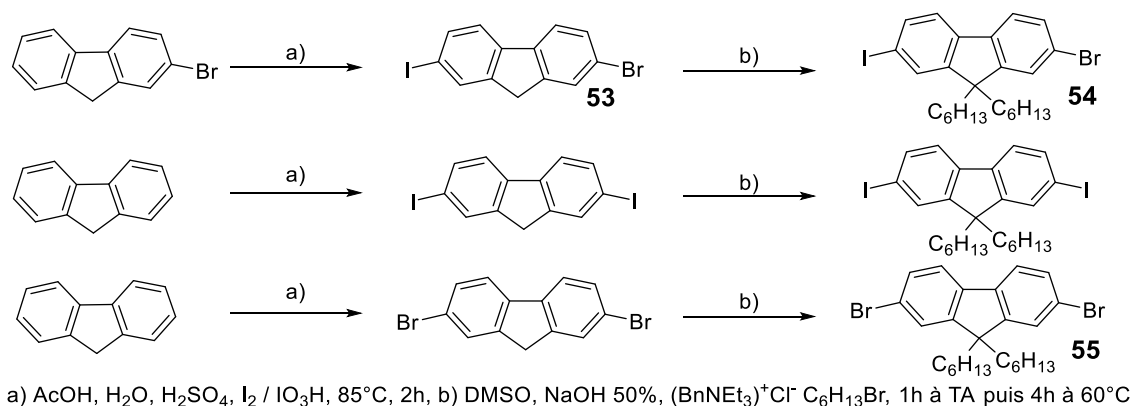


a) Pd(PPh₃)₂Cl₂, CuI, PhI₂, THF/Et₃N, TA, 12h; b) Pd(PPh₃)₂Cl₂, CuI, **52**, THF/Et₃N, TA, 12h

Figure 3- 13 : Voie de synthèse de 0P0-OAc et 0PP0-OAc.

II.3.d) Famille des fluorènes

La troisième famille de sondes est basée sur des cœurs fluorènes en remplacement des groupes anthracènes ou phényles. La synthèse des fragments fluorènes est décrite Figure 3- 14. Pour les mêmes raisons que pour le groupement phényle, les composés di-iodo et iodo-bromo fluorène ont été synthétisés.



a) AcOH, H₂O, H₂SO₄, I₂ / IO₃H, 85°C, 2h, b) DMSO, NaOH 50%, (BnNEt₃)⁺Cl⁻ C₆H₁₃Br, 1h à TA puis 4h à 60°C

Figure 3- 14 : synthèse des cœurs fluorènes.

La position méthylénique 9 du fluorène étant très sensible à l'oxydation, l'introduction des chaînes alkyles (hexyles) a été effectuée sur cette position. La suite de la synthèse repose sur une succession de couplage de Sonogashira. Selon le même schéma synthétique que pour les dérivés portant les phényles, on obtient les dérivés **0F0-OAc** (Figure 3- 17), **0FF0-OAc** (Figure 3- 16), et **0F-F0-OAc** (Figure 3- 15).

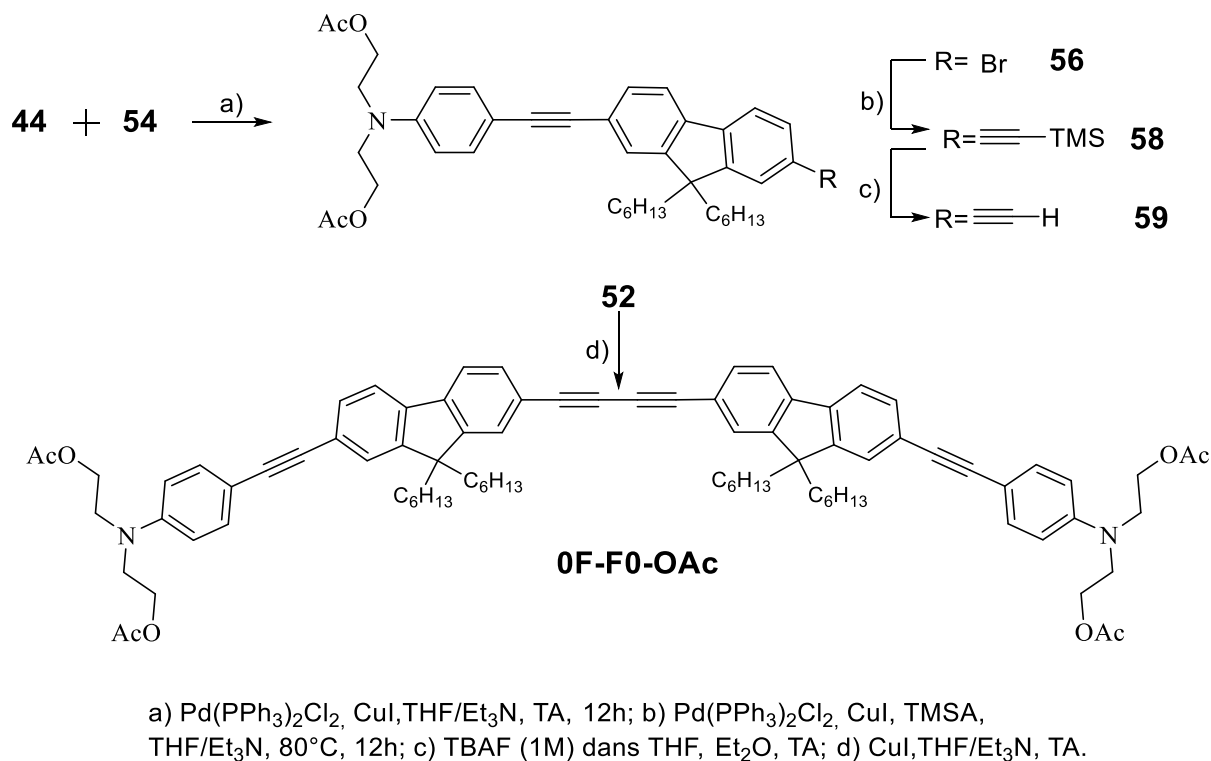


Figure 3- 15 : Synthèse du chromophore 0F-F0-OAc.

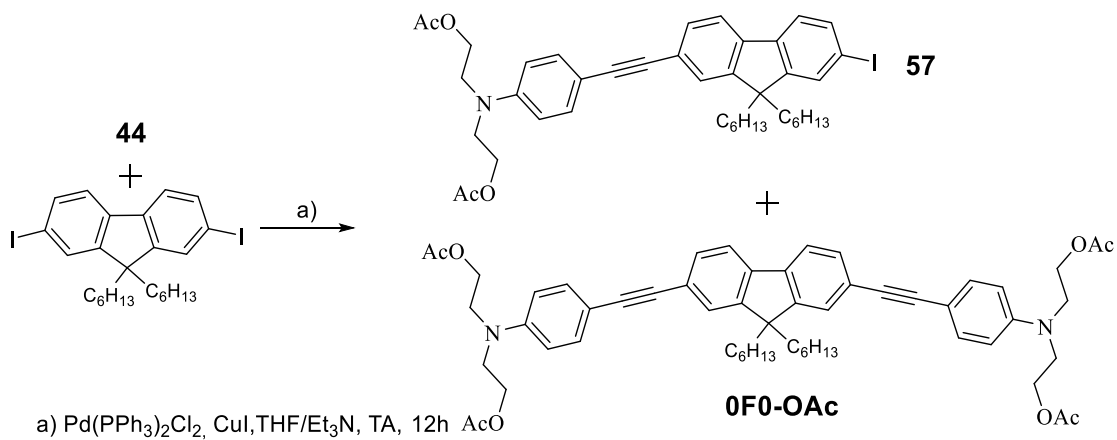


Figure 3- 16 : Synthèse de 0F0-OAc.

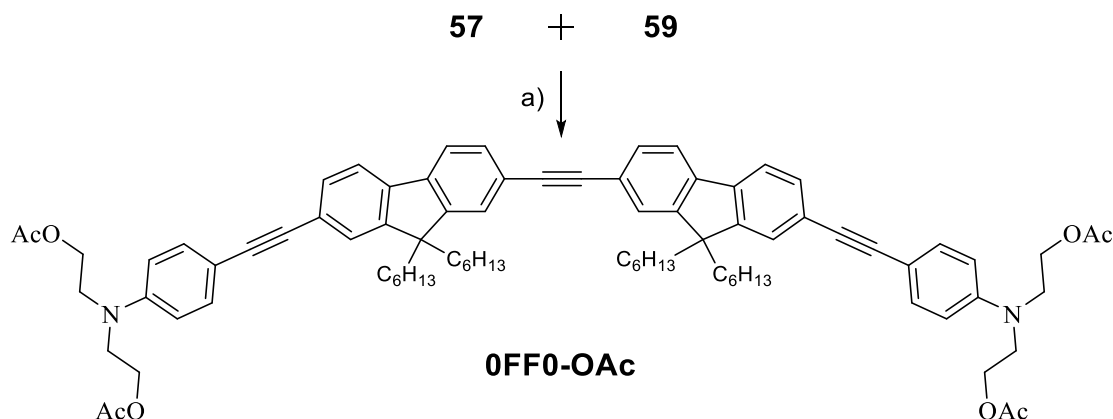


Figure 3- 17 : Synthèse de 0FF0-OAc.

II.4) Etudes spectroscopiques des précurseurs

II.4.a) Présentation des résultats

Les spectres d'absorption et d'émission de l'ensemble des chromophores de l'étude ont ensuite été mesurés en solution diluée dans des solvants de différentes polarités. Les valeurs de section efficace d'absorption biphotonique dans la gamme des longueurs d'onde du laser Ti-Saphir ont par ailleurs été mesurées par TPIF pour chaque chromophore dans le chloroforme. L'ensemble des résultats de cette étude spectroscopique est regroupé dans le Tableau 3- 3.

	Solvant	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	ϕ_F (%)	ϵ (mol.L ⁻¹ .cm ⁻¹)	σ_{TPA} GM	$\lambda_{\text{max}}^{TPA}$ (nm)	$f(\text{GM})$ 800nm
0P0-OAc	Toluène	363	399	2486	84,4				
	CHCl ₃	377	407	1955	81,5	102000	>115	<720	6
	DMSO	374	466	5279	71,8				
0PP0-OAc	Toluène	372	416	2843	67,6				
	CHCl ₃	387	434	2798	92,6	123000	>480	<720	68
	DMSO	384	542	7591	54,5				
0P-P0-OAc	Toluène	386	430	2651	62,4				
	CHCl ₃	393	454	3419	74,6	101000	775	730	126
	DMSO	399	602	8451	16,3				
0F0-OAc	Toluène	380	410	1926	85,9				
	CHCl ₃	363	414	3394	84,9	77500	>167	<720	38
	DMSO	385	486	5398	81,8				
0FF0-OAc	Toluène	387	422	2143	64,9				
	CHCl ₃	373	425	3280	87,2	113000	>815	<720	155
	DMSO	394	546	7066	38,5				
0F-F0-OAc	Toluène	397	428	1824	59,7				
	CHCl ₃	385	426	2500	78,7	125000	>855	<720	177
	DMSO	403	575	7423	11,5				
0A0-OAc	Toluène	476	528	2069	100				
	CHCl ₃	475	536	2396	100	49000	333	750	255
	DMSO	513	609	3073	100				
0AA0-OAc	Toluène	522	591	2237	24.3				
	CHCl ₃	523	598	2398	26.1	64000	503	760	145
	DMSO	549	695	3826	28.5				
0A-A0-OAc	Toluène	515	585	2323	20.0				
	CHCl ₃	514	595	2649	23.4	62000	638	770	500
	DMSO	541	715	4498	7.5				

Tableau 3- 3 : Propriétés spectroscopiques des nouvelles familles phényle, fluorène et anthracène.

II.4.b) Evolution des propriétés spectroscopiques

Les spectres d'absorption et d'émission sont représentés respectivement Figure 3- 18 et Figure 3- 19 dans le toluène, Figure 3- 20 et Figure 3- 21 dans le CHCl₃ et, Figure 3- 22 et Figure 3- 23 dans le DMSO. De manière générale, Les bandes d'absorption et d'émission sont larges et caractéristiques d'un couplage vibronique classique pour des molécules possédant un fort transfert de charge. Il faut noter que si les chromophores à cœur phényles et fluorènes présentent des positions similaires en terme de maxima d'absorption et d'émission, les chromophores anthracènes sont comparativement fortement décalés vers le rouge. En ce qui concerne l'absorption, on peut globalement remarquer que dans chaque famille les maxima varient peu, que ce soit en fonction du solvant, de la taille du chromophore ou du type de conjugaison centrale. Ceci indique un transfert de charge de même nature entre l'état fondamental et l'état excité de plus basse énergie de ces différents chromophores.

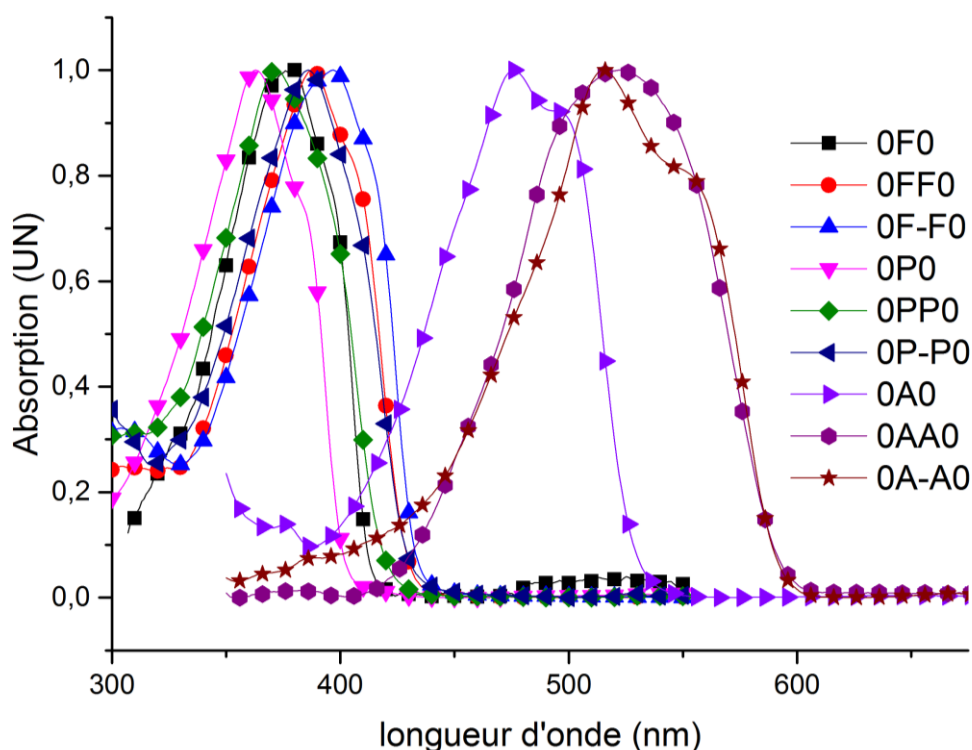


Figure 3- 18 : Absorption dans le toluène.

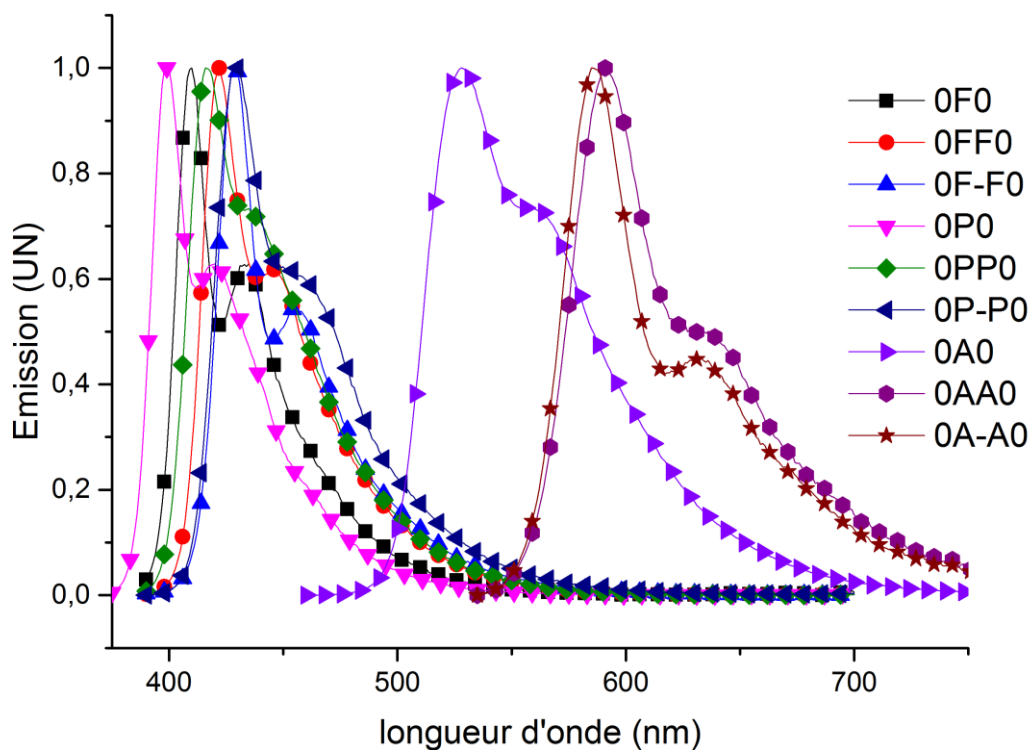


Figure 3- 19 : Emission dans le toluène.

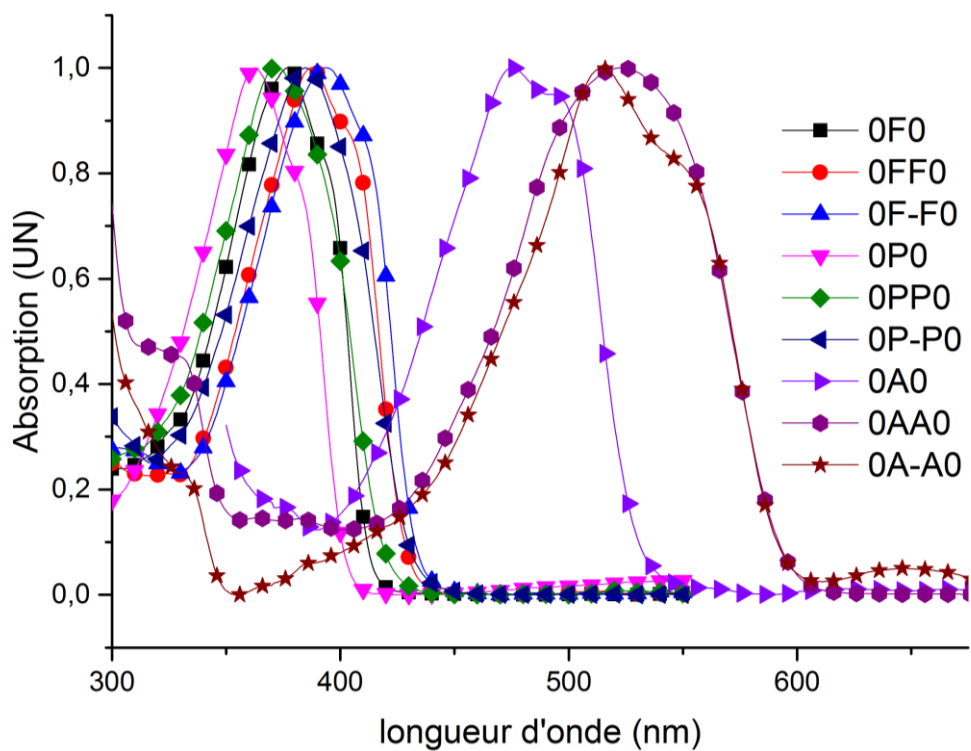


Figure 3- 20 : absorption dans le CHCl_3 .

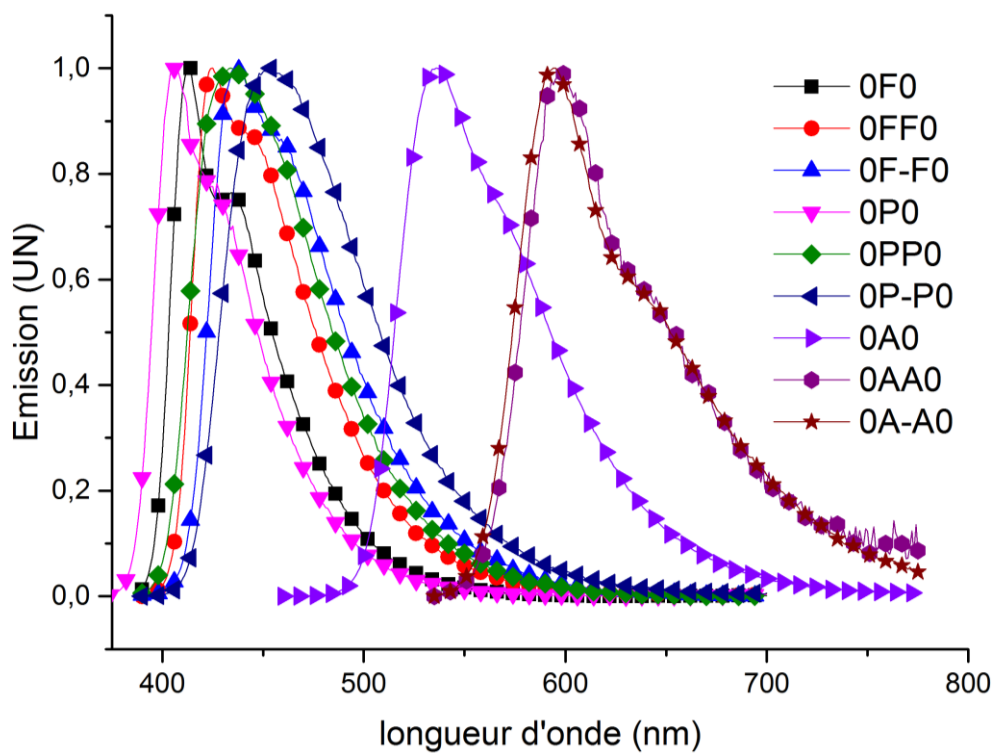


Figure 3- 21 : émission dans le CHCl₃.

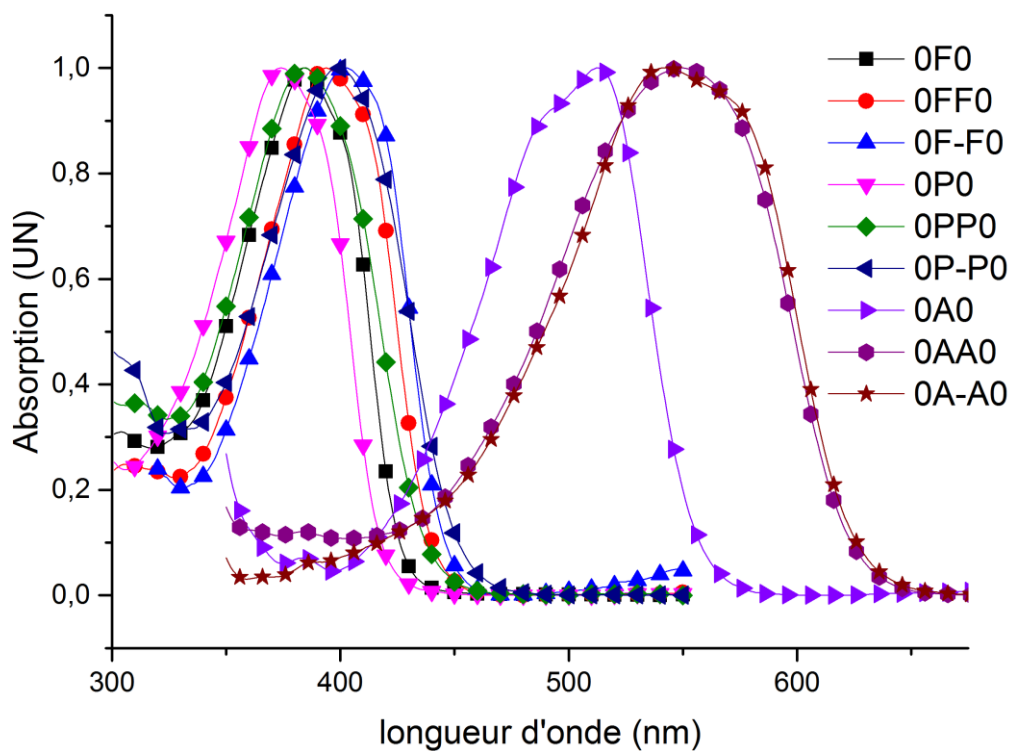


Figure 3- 22 : Absorption dans le DMSO.

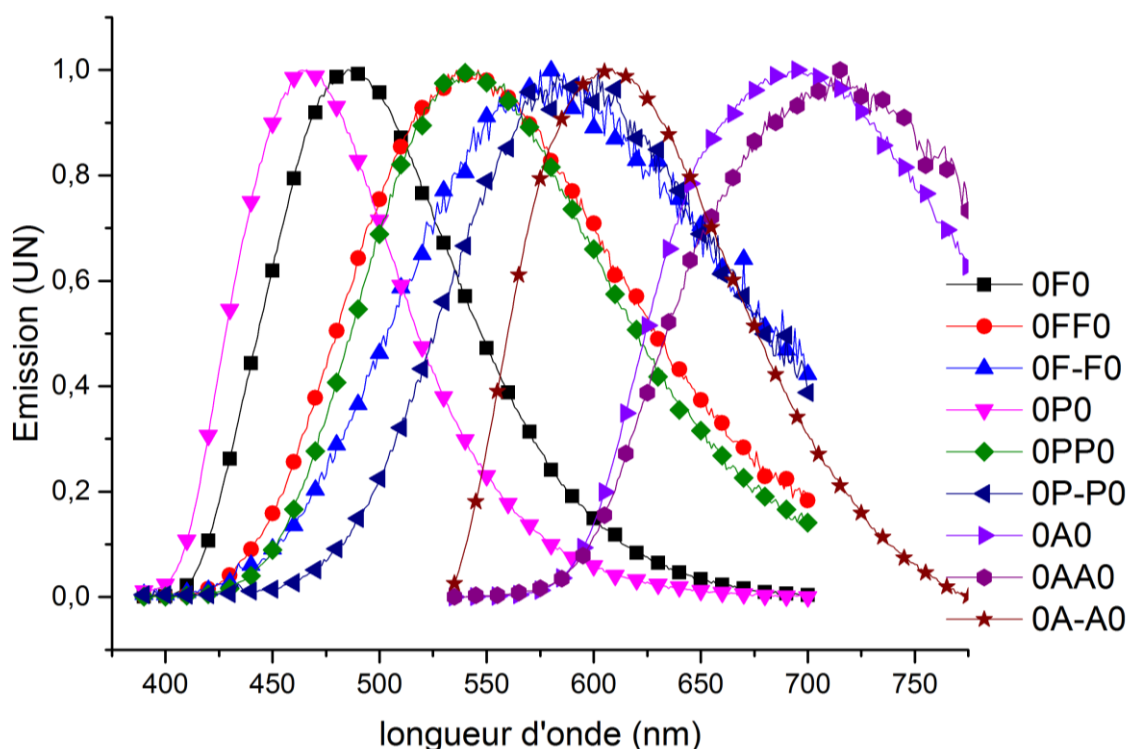


Figure 3- 23 : Emission dans le DMSO.

Les spectres d'émission des différents chromophores dans le toluène montrent une structure vibronique. Qualitativement, on observe peu d'évolution dans le CHCl_3 par rapport au toluène, que ce soit dans la position des maxima ou dans l'enveloppe du spectre, la structure vibronique étant globalement conservée. Dans ces deux solvants, les rendements quantiques sont importants. On peut noter que le rendement quantique diminue quand l'émission est décalée vers le rouge, phénomène classiquement attribué à des couplages vibroniques entre l'état excité et l'état fondamental[280]. Pour chaque chromophore, un fort solvatochromisme dans le DMSO est observé, indiquant une forte réorganisation de l'état excité dans ce solvant polaire. Ce déplacement bathochrome (et donc la diminution du rendement quantique) est d'autant plus important que le système conjugué est étendu. Cette information permet de supposer une réorganisation importante à l'état excité par rapport à un état fondamental distordu, suivant le modèle introduit au chapitre 2. Il faut noter que le solvatochromisme est bien plus fort pour les sondes phényles. Les propriétés spectroscopiques des familles fluorènes et phényles suivent les mêmes évolutions que les familles poly-bromées correspondantes, notamment en ce qui concerne les évolutions spectrales observées entre les chromophores possédant un pont central alcyne ou dyine. Le phénomène de torsion induit par la liaison diyne semble moins déterminant sur la famille anthracène où les propriétés

spectroscopiques de **0A-A0-OAc** et de **0AA0-OAc** restent proches. Une discussion sur le phénomène de torsion sera menée plus en détail pour la molécule **0A-A0-OAc** qui a été sélectionnée pour la suite de notre étude.

Ces composés présentent une forte variation de la section efficace d'ADP en fonction de la longueur de conjugaison. Même-si l'ensemble des bandes n'est pas accessible pour tous les composés, les tétramères di-yne possèdent toujours une section efficace supérieure à leurs homologues tétramères simples. Enfin, les trimères ont les sections efficaces les plus faibles. La nature des groupements **P**, **A** et **F** est aussi importante et joue sur la nature de la section efficace ce qu'on peut aussi relier à la longueur de conjugaison. Les valeurs de section efficace, augmentent dans l'ordre **P**, **A** et **F** ce qui suit l'évolution de l'augmentation de la longueur de conjugaison.

II.4.c) Sélection de la sonde la plus compétitive

Malgré une section efficace d'absorption sensiblement moindre que celle des autres composés de l'étude, la sonde **0A0-OAc** possède la plus forte brillance à deux photons, en raison d'un rendement quantique d'émission particulièrement élevé. Cependant son utilisation est limitée à cause d'une émission en dehors de la FTB. Suivant ce critère, deux sondes semblent particulièrement adaptées pour l'imagerie de vascularisation cérébrale : **0A-A0-OAc** et **0AA0-OAc**. **0AA0-OAc** possède une longueur d'onde d'émission (695 nm, DMSO) et une section efficace (500 GM) moins adaptés que **0A-A0-OAc** (715 nm, DMSO ; 638 GM), mais qui sont compensés par un rendement de luminescence supérieure (26 vs 23). Néanmoins, la molécule **0A-A0-OAc** a été seule retenue pour la suite de l'étude du fait de sa synthèse sensiblement plus simple à mener sur des échelles importantes.

III Obtention et études spectroscopiques d'une sonde hydrosoluble et de son précurseur

III.1) Obtention du précurseur et de la sonde polymère

L'introduction des chaînes polymères sur le fluorophore par méthode ATRP requiert la présence de groupements initiateurs de polymérisation. Afin d'introduire ce dernier, les fonctions alcool sont tout d'abord générées par déprotection des groupements acétate en milieu basique. Le groupement amorceur de la polymérisation a alors été introduit par réaction d'estérification à partir du bromure de 2-bromo-2-méthylpropanoyl. La dernière étape est celle de polymérisation (ATRP) utilisant du 2-Hydroxyéthyl-acrylate comme monomère, le couple CuBr/Bipyridine comme système

catalytique et THF comme co-solvant. La polymérisation par ATRP présente les avantages suivants[281-283] :

- Comme réaction de polymérisation contrôlée, elle permet d'avoir d'excellents indices de poly-dispersité.
- Ce sont des réactions tolérantes vis-à-vis de nombreuses fonctions.
- Les réactifs sont souvent peu chers et la procédure de mise en œuvre est simple.

0A-A0-In est obtenu avec un rendement global de 15% à partir du dibromo-anthracène commercial (Figure 3- 24).

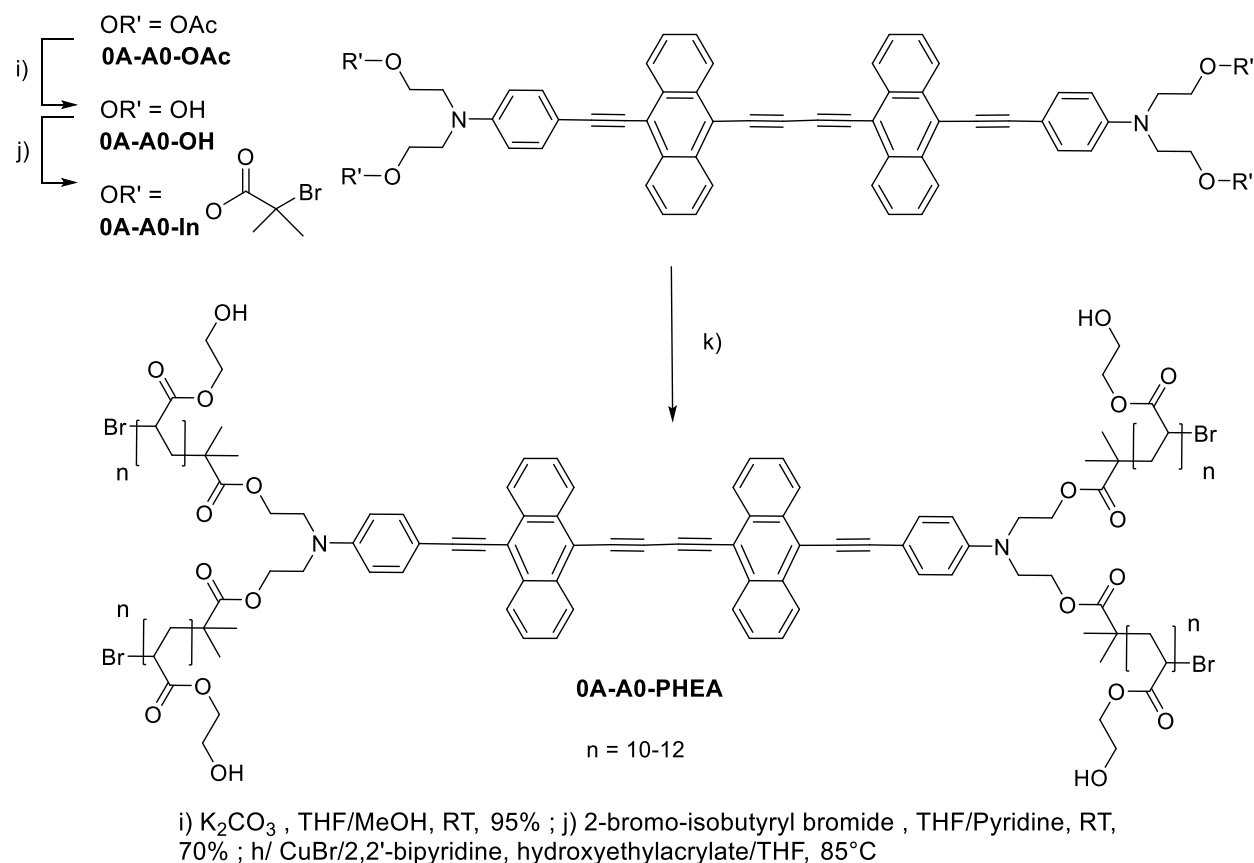


Figure 3- 24 : Passage du chromophore 0A-0A-OAc au chromophore hydrosoluble 0A-A0-PHEA.

Le polymère obtenu est soluble dans le sérum physiologique à des concentrations de 50mg par mL. Il présente un indice de polydispersité M_w/M_n de 1.5 (mesuré par SEC), ce qui est une valeur tout à fait classique pour ce type de polymérisation. La RMN permet de déterminer une longueur de chaîne entre 10 et 12 unités monomères.

La molécule obtenue et le précurseur de polymérisation ont alors été analysés en spectroscopie d'absorption et de fluorescence.

III.2) Solvatochromisme et rendement quantique de fluorescence

III.2.a) Propriétés d'absorption et d'émission

L'étude de propriétés spectroscopiques a pour but de déterminer les paramètres clés de la molécule synthétisée dans le contexte de l'imagerie de fluorescence à deux photons. Une étude similaire à celle réalisé sur les précurseurs acétates mais une gamme de solvant plus importante a été utilisée ici (Figure 3- 25, Figure 3- 26, Tableau 3- 4). Dans cette partie les chromophores **0A-0A-In** et **0A-A0-PHEA** seront comparés à **0A0-In** et **0A0-PHEA**.

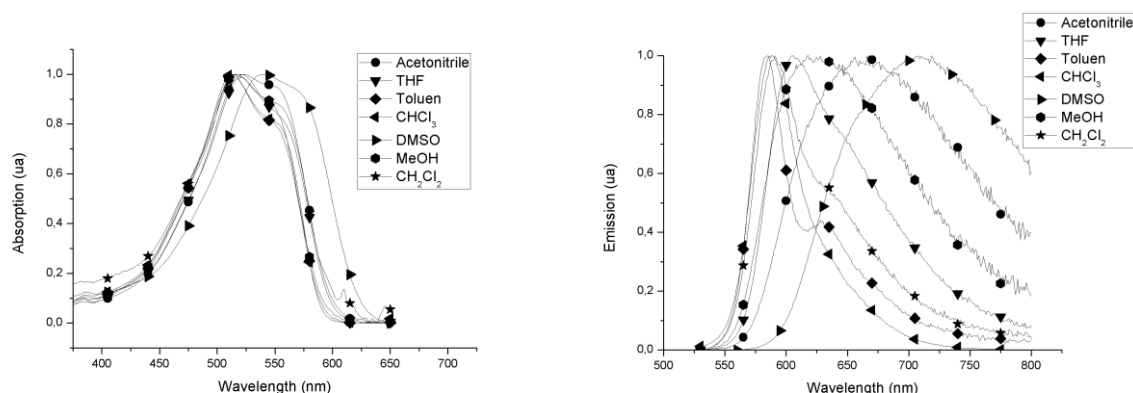


Figure 3- 25 : Solvatochromisme d'absorption et d'émission de 0A-A0-In.

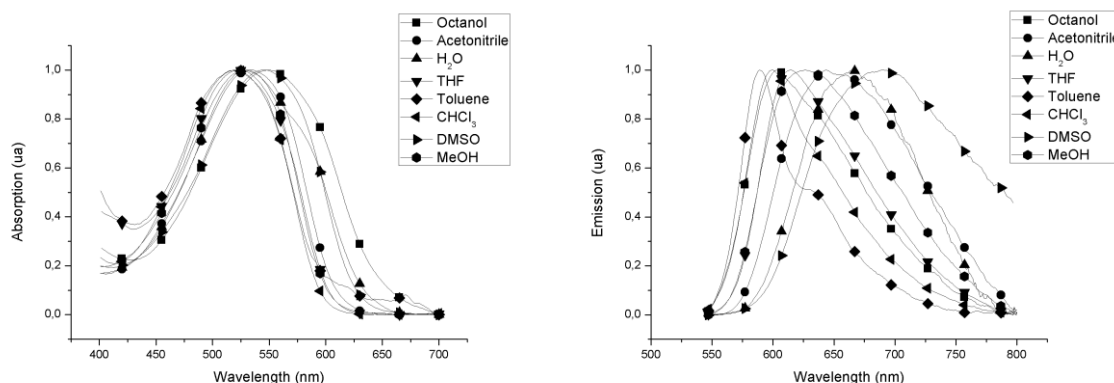


Figure 3- 26 : Solvatochromisme d'absorption et d'émission de 0A-A0-PHEA.

	Solvant	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\nu$ (cm^{-1})	ϕ_F	ϵ ($\text{mol.L}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	τ_f (ns)	k_r (s^{-1})	k_{nr} (s^{-1})
0A-A0-In	MeOH	515	618	3236	0.2	-	0.74	$2,31.10^{+08}$	$1,13.10^{+09}$
	Acetonitrile	522	666	4142	0.11	-	0.67	$1,65.10^{+08}$	$1,33.10^{+09}$
	DMSO	540	700	4233	0,04	62000	0.54	$7,41.10^{+07}$	$1,78.10^{+09}$
	THF	521	605	2665	0.28	67600	0.82	$3,43.10^{+08}$	$8,81.10^{+08}$
	CH_2Cl_2	516	591	2459	0.23	44500	0.78	$2,94.10^{+08}$	$9,83.10^{+08}$
	CHCl_3	512	588	2524	0.18	-	0.50	$3,57.10^{+08}$	$1,63.10^{+09}$
	Toluène	513	584	2370	0.17	65700	0.39	$4,40.10^{+08}$	$2,15.10^{+09}$
0A-A0-PHEA	eau	528	654	3649	0.06	37300	1.35	$4,44.10^{+07}$	$6,96.10^{+08}$
	MeOH	525	627	3099	0.16	-	0.71	$2,26.10^{+08}$	$1,19.10^{+09}$
	Acétonitrile	534	645	3223	0.23	-	1.27	$1,81.10^{+08}$	$6,06.10^{+08}$
	DMSO	545	694	3939	0.14	-	1.13	$1,24.10^{+08}$	$7,61.10^{+08}$
	octanol	550	602	1571	0.06	-	0.85	$7,09.10^{+07}$	$1,11.10^{+09}$
	THF	522	614	2870	0.08	-	1.26	$6,35.10^{+07}$	$7,30.10^{+08}$
	CHCl_3	519	599	2573	0.18	-	0.40	$4,46.10^{+08}$	$2,03.10^{+09}$
	Toluène	520	592	2339	0.08	-	-	-	-

Tableau 3- 4 : Données spectroscopiques de 0A-A0-In et 0A-A0-PHEA.

L'évolution générale des maxima d'absorption et d'émission est globalement identique à celle précédemment détaillée pour **0A-A0-OAc**, caractéristique des chromophores à fort transfert de charge intramoléculaire (ICT). Le caractère ICT de la transition est confirmé par des calculs de TD-DFT réalisés en collaboration avec T. Le Bahers au Laboratoire de Chimie de l'ENS de Lyon. La variation de la densité électronique entre l'état fondamental et le premier état excité fait apparaître que la transition énergétique est caractérisée par un déplacement de la densité des groupements anilines périphériques vers les groupements anthracènes centraux. La Figure 3- 27 montre en vert les zones où la densité électronique augmente et en rouge les zones où elle diminue.

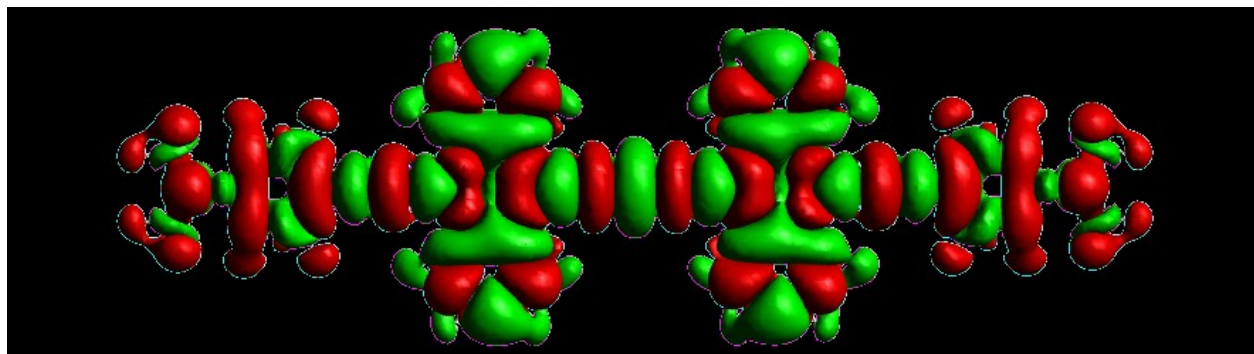


Figure 3- 27 : Représentation de la densité électronique sur le cœur organique, montrant un transfert de charge vers le centre de la molécule (calculé TD-DFT).

Bien que l'on observe des variations de rendement quantique et de temps de vie de fluorescence, les évolutions des constantes cinétiques radiatives (k_r) et non radiatives (k_{nr}) apparaissent erratiques. Les variations de polarité du solvant n'ont qu'un effet limité sur l'énergie d'absorption. Elles ont cependant un effet sur la longueur d'onde d'émission. Ces observations sont cohérentes avec le solvatochromisme positif déjà évoqué. On peut voir que les effets du solvatochromisme sont identiques pour l'initiateur et le polymère. Cette observation contraste avec les études précédentes (**0A0-PHEA**) utilisant le même polymère. La présence d'une couche de polymère (première sphère de solvation) induisait un effet tampon sur le solvatochromisme. Cette différence peut être expliquée par le fait que la longueur de chaîne polymère est conservée dans ces différents exemples. L'allongement du cœur organique du chromophore fait, que par comparaison, les chaînes polymères sont plus courtes. La couche de polymère ne joue alors plus le rôle de la première sphère de solvation et le chromophore est davantage sujet aux effets de solvant. Par cette particularité et sa solubilité dans l'eau **0A-A0-PHEA** apparaît comme un bon candidat en tant que sonde de polarité de type quadripôle. Une deuxième conséquence de l'allongement du cœur du chromophore est l'augmentation du caractère hydrophobe de la sonde par rapport aux systèmes déjà reportés. Cette différence pourra avoir des conséquences sur le comportement de cette sonde en milieu biologique.

Le solvatochromisme observé pour **0A-A0-In** est similaire à celui mesuré pour **0A0-In**. L'augmentation de la polarité du toluène au DMSO induit un décalage vers le rouge de 2240 cm^{-1} et 2440 cm^{-1} respectivement pour **0A0-In** et **0A-A0-In**. La variation du solvatochromisme peut être reliée à l'extension du transfert de charge intramoléculaire qui est similaire dans les deux molécules. Par opposition, le déplacement de Stokes de **0A-A0-In** est systématiquement plus important que pour **0A0-In**. Il est respectivement de 750 cm^{-1} et 2370 cm^{-1} dans le toluène et décalé

à 2100 cm^{-1} et 4230 cm^{-1} dans le DMSO pour **0A0-In** et **0A-A0-In**. Ce comportement se retrouve dans les dérivés hydrosolubles où, dans l'eau, le déplacement de Stokes est de 2060 cm^{-1} pour **0A0-PHEA** et de 3650 cm^{-1} pour **0A-A0-PHEA**. Ces observations indiquent clairement une réorganisation énergétique plus importante entre l'état fondamental et l'état excité dans **0A-A0-In/PHEA** par rapport à **0A0-In/PHEA**. Cela est cohérent avec le modèle énoncé dans le chapitre 2 supposant une transition d'un état fondamental distordu à un état excité plan type quinoïdal.

III.2.b) Evolution des propriétés à deux photons

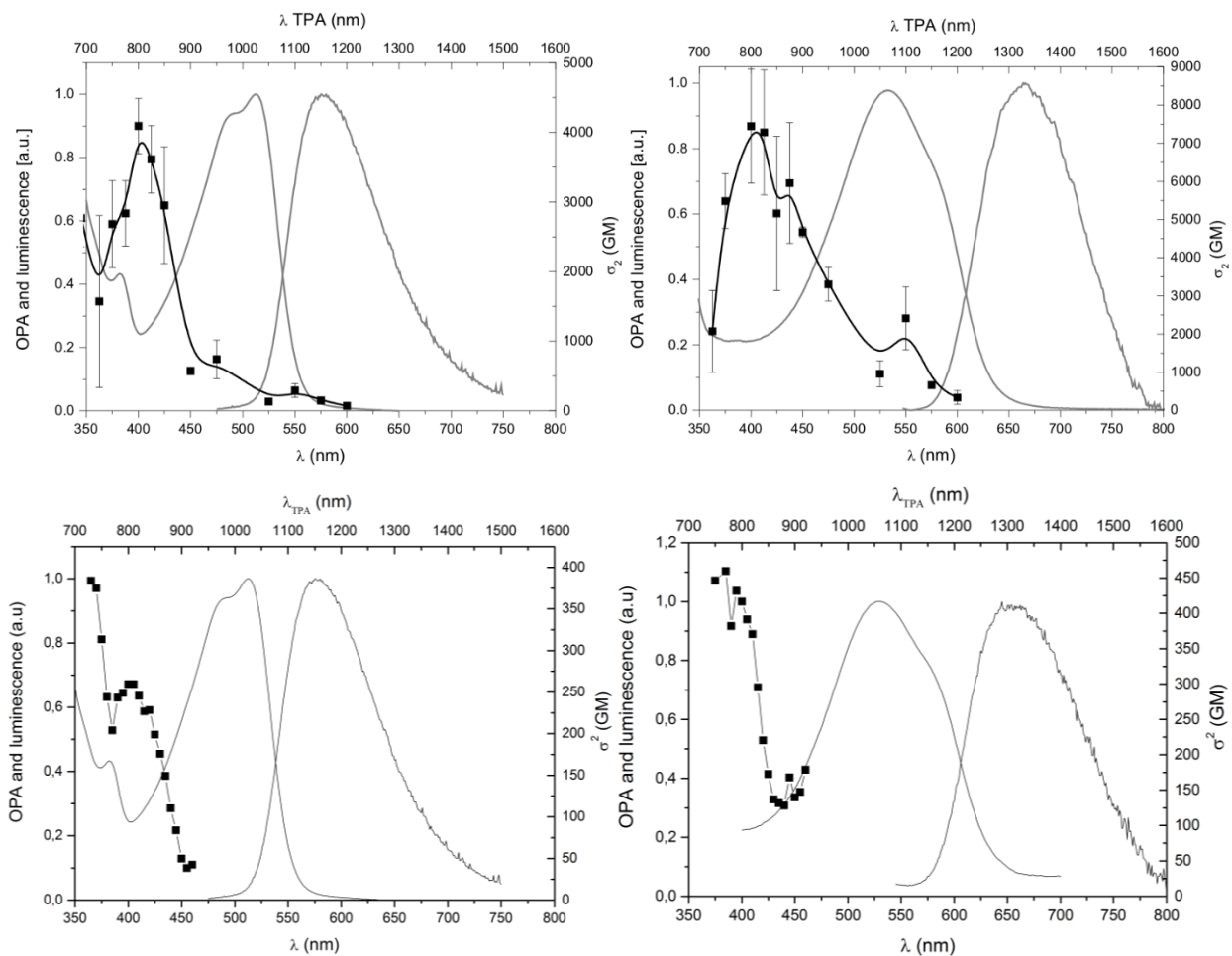


Figure 3- 28 : Spectre d'ADP pour **0A0-PHEA** (gauche) et **0A-A0-PHEA** (droite). Spectre d'ADP obtenu par la méthode Z-scan (haut) par la méthode TPIF (bas).

La section efficace d'ADP de **0A-A0-PHEA** a été enregistrée par méthode Z-scan en utilisant un laser pulsé dans une gamme située entre 700 et 1200 nm (Figure 3- 28). On peut noter que deux contributions apparaissent dans ce spectre : 1/ Une transition de basse énergie, superposable à la transition $S_1 \leftarrow S_0$ observée à un photon, théoriquement interdite pour les molécules centro-

symétriques. 2/ Une transition de plus haute énergie, attribuée à la transition $S_2 \leftarrow S_0$. La présence de la bande $S_1 \leftarrow S_0$ semble indiquer une brisure partielle de la centrosymétrie de la molécule. La plus faible intensité de cette dernière ($\sigma_{\text{TPA}} = 3000 \text{ GM}$) comparé à la transition $S_2 \leftarrow S_0$ ($\sigma_{\text{TPA}} = 7000 \text{ GM}$) montre que ce phénomène n'est que partiel. Ces résultats suggèrent que **0A-A0-PHEA** existe sous deux conformations à l'état fondamental en solution : une conformation plane / centrosymétrique et une conformation décalée/non centrosymétrique. Les propriétés d'ADP mesurées par méthode TPIF donnent des résultats très différents $\sigma_{\text{TPA}} = 260 \text{ GM}$ pour **0A0-PHEA** et $\sigma_{\text{TPA}} = 420 \text{ GM}$ pour **0A-A0-PHEA** à 800nm (Figure 3- 28) mais les valeurs semblent plus cohérentes pour ce type de chromophore.

Afin de clarifier ces observations, des calculs de DFT et TD-DFT ont été réalisés. Les scans de relaxation ont été calculés selon l'angle de torsion (angle θ représenté sur la Figure 3-29) du pont di-yne. Les résultats de ces calculs montrent que la géométrie de l'état fondamental de la molécule possède au moins deux minima locaux correspondant à des angles $\theta = 0^\circ$ et $\theta = 90^\circ$. La géométrie plane ($\theta = 0^\circ$) est légèrement plus stable de 1.3 kJ.mol^{-1} par rapport à la géométrie où les fragments anthracènes sont perpendiculaires ($\theta = 90^\circ$). Ces deux minima locaux d'énergie sont séparés par une barrière de transition très basse, estimée à 1.5 kJ.mol^{-1} . En conséquence, la rotation autour de l'angle dièdre du pont di-yne est thermiquement réalisée à température ambiante. En utilisant la loi de Boltzmann pour la population de l'état fondamental entre ces deux minima locaux, on trouve que 37% des molécules sont dans un état $\theta=90^\circ$ et 63% avec un $\theta=0^\circ$. Ce résultat est en adéquation avec les observations expérimentales. Une proportion significative des molécules n'est pas plane et donc pas centrosymétrique, à l'état fondamental. La présence en solution d'une population significative de cette seconde structure distordue pourrait expliquer la seconde transition observée sur le spectre d'ADP pour **0A-A0-PHEA**, en contradiction apparente avec les règles de sélection à deux photons pour les molécules centrosymétriques.

Le calcul du niveau énergétique de l'état excité de la molécule en fonction de l'angle dièdre montre que le minimum local à 90° devient un maximum absolu à l'état excité. La barrière énergétique de rotation est par ailleurs beaucoup plus importante à l'état excité 28.6 kJ.mol^{-1} . En conséquence la barrière de rotation n'est plus thermodynamiquement franchissable et la molécule adopte une conformation rigoureusement plane. Ceci explique la forte réorganisation observée au cours de la transition électronique, et donc le déplacement de Stokes important mesuré.

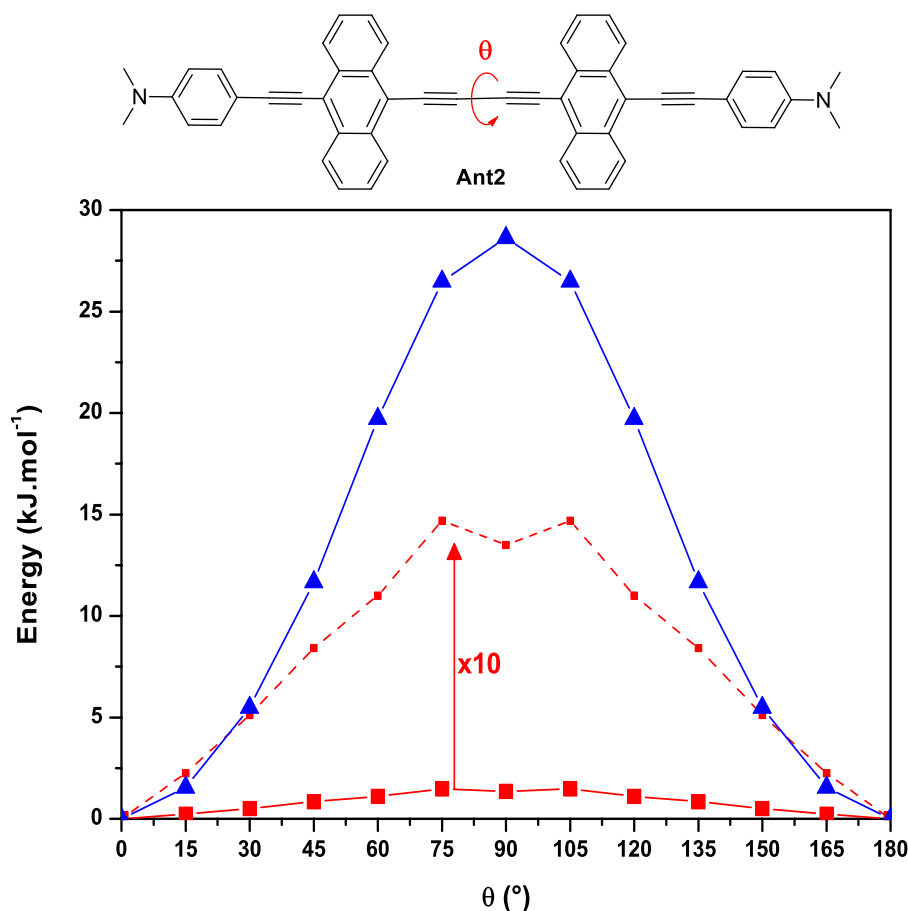


Figure 3-29 : Structure modèle pour les calculs DFT (haut). Evolution de l'énergie de l'état fondamental (courbe rouge), zoomé dix fois (courbe rouge pointillé) et de l'état excité (courbe bleu) en fonction de l'angle de torsion θ .

III.2.c) Bilan des propriétés spectroscopiques de 0A-A0-PHEA

Les propriétés spectroscopiques dans l'eau sont déterminantes dans le cadre de l'imagerie intravitale. Dans ce solvant, **0A-A0-PHEA** possède une longueur d'émission à 654 nm, c'est à dire dans le rouge à la limite de la fenêtre de transparence biologique. Néanmoins, cette longueur d'onde est obtenue au détriment du rendement quantique, qui ne s'élève qu'à 0,06 environ. Cette valeur reste malgré tout acceptable pour un chromophore organique dans cette gamme spectrale.

La valeur du rendement quantique de fluorescence honnête (6%) avec une émission dans le rouge (654nm) est décevante par rapport aux attentes placées dans ce chromophore. En effet, la brillance à deux photons de 24 GM en TPIF et de 450 GM en Z-scan est petite comparée aux 238 GM (TPIF, 4000GM en Z-scan) pour **0A0-PHEA** et aux 97 GM pour **Lem-PHEA** en TPIF. La solubilisation du chromophore (20mg/mL) dans le sérum physiologique est satisfaisante. L'avantage d'**0A-A0-**

PHEA est que sa section efficace d'ADP maximum (400GM) est obtenue pour une longueur de 800nm qui correspond à la longueur d'onde où le laser Ti-Saphir peut délivrer un maximum de puissance. Ce chromophore a été testé lors d'une série de manipulation pour être comparé au **Lem-PHEA**.

IV Tests biologiques et applications

Des expériences d'angiographie sur le cerveau de souris suivie par TPLSFM ont été réalisées en collaboration avec F. Appaix, de l'institut des neurosciences de Grenoble et B. Van Der Sanden, de Clinatex, Grenoble, dans le but de voir l'influence des propriétés spectroscopiques en solution sur l'imagerie *in vivo*.

IV.1) Protocole expérimental

Dans un premier temps, la préparation de l'échantillon à une concentration de 5mg/mL dans une solution de sérum physiologique est réalisée facilement. La présence de quatre bras polymères permet en effet cette hydrosolubilisation. Le protocole expérimental est le suivant :

- Une souris est anesthésiée en utilisant un gaz contenant 5% d'isoflurane dans un mélange de gaz composé d'air et de dioxygène dans la proportion 7/3.
- Suivant les cas, une craniotomie de 2-3 mm de diamètre ou alternativement un polissage de la boîte crânienne est réalisé dans la zone du cortex moteur (Figure 3- 30).
- Un cathéter est posé sur la queue de la souris permettant l'injection de 100 μ L de l'échantillon Ant2-PHEA. Le cathéter peut aussi servir à injecter l'IsoThioCyanate Fluorescein -dextran (FITC-dextran, 70 kDa) dilué à 100 mg/ml dans du sérum physiologique (0.1 ml). Le FITC-dextran permet de marquer spécifiquement le plasma sanguin, et est donc utilisé comme sonde contrôle dans nos protocoles d'imagerie.
- La microscopie TPLSFM est réalisée sur microscope LSM 7MP de Zeiss équipé d'un objectif à immersion dans l'eau $\times 20$. L'épifluorescence est récoltée entre deux filtres entre 550 nm et 673 nm. L'irradiation laser à 800 nm est obtenue avec un laser Ti:Saphir délivrant une puissance en surface du cortex inférieure à 50 mW. Le mode d'acquisition se fait selon l'axe Z avec un scan du plan x-y de dimension $607 \times 607 \mu\text{m}$ et une distance de $2 \mu\text{m}$ entre chaque plan focal.
- Les projections selon z et les reconstructions 3D sont alors obtenues avec respectivement les logiciels ImageJ et Vaa3D.

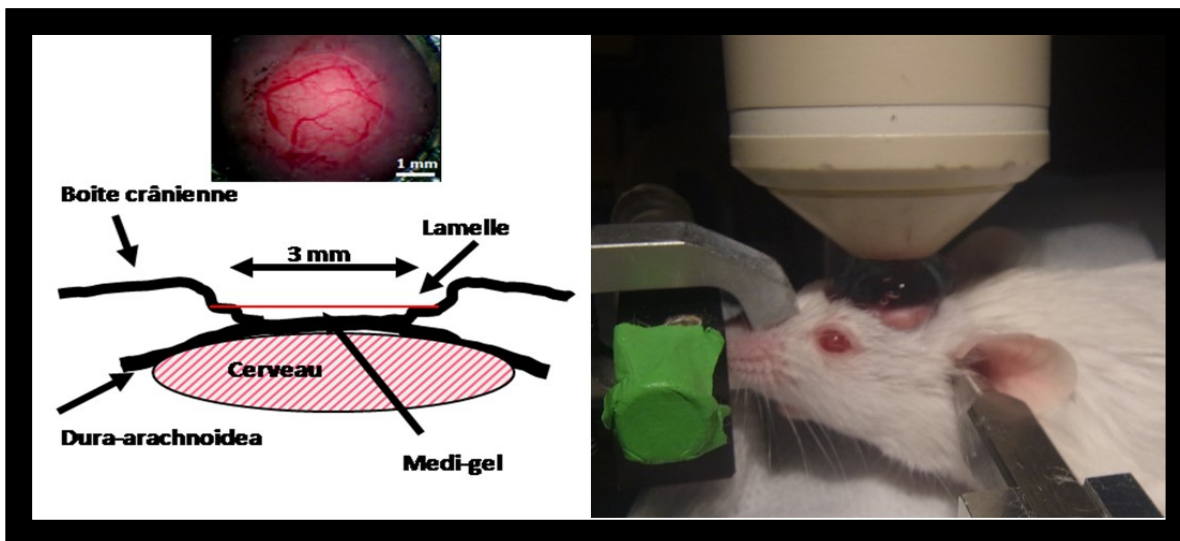


Figure 3- 30 : Principe de la craniotomie (gauche) et dispositif expérimental avec l'objectif du microscope (droite).

Le marquage de la vascularisation cérébrale par **0A-A0-PHEA** est observé pendant plusieurs heures sans perte significative d'intensité, ce qui est indicatif d'une bonne photo-stabilité. Ce paramètre est très bénéfique pour des applications en imagerie, spécifiquement dans le cadre de protocoles nécessitant des temps d'acquisition lents, car il permet une fenêtre d'acquisition assez longue avec une seule injection. Les paramètres physiologiques de la souris tels que les rythmes cardiaques et pulmonaires ne subissent pas de modification détectable durant toute la durée de l'expérience, ce qui indique une biocompatibilité de la sonde satisfaisante à court-terme.

IV.2) Vascularisation sanguine : imagerie *in vivo*

L'excitation biphotonique de **0A-A0-PHEA** à 800 nm permet de collecter un fort signal d'émission de la sonde, dont l'intensité maximale est enregistrée sur le canal rouge de détection 550 nm-673 nm. Ces observations sont cohérentes avec les données spectroscopiques mesurées. La bonne brillance à deux photons de la molécule permet d'imager la vascularisation du cerveau dans la zone du néo-cortex avec une profondeur de 600 μm (Figure 3- 31). Cette valeur est importante mais reste classique pour les sondes à deux photons émettant dans le rouge et le proche infra-rouge (exemple du **Lem-PHEA**). Cependant, à l'inverse de la plupart de ces sondes, **0A-A0-PHEA** permet d'obtenir des profondeurs de pénétration de 400 μm après un simple un polissage de la boîte crânienne. Cette performance est remarquable si on considère les phénomènes de diffusion très importants induits par les tissus superficiels de la boîte crânienne et montre l'intérêt d'augmenter la brillance à deux photons à 800 nm. La comparaison des résultats obtenus avec **0A0-**

PHEA illustre clairement le bénéfice d'un décalage vers le rouge du spectre d'émission : pour ce chromophore, qui possède un maximum une section efficace d'absorption biphotonique comparable à **0A-A0-PHEA**, une émission près de 10 fois supérieure, mais centrée à 570 nm, seule une profondeur de 450 μm avec craniotomie, dans des conditions d'excitation et une configuration de détecteur similaires, est obtenue (Figure 3- 32). Aucune image exploitable n'est obtenue sans craniotomie.

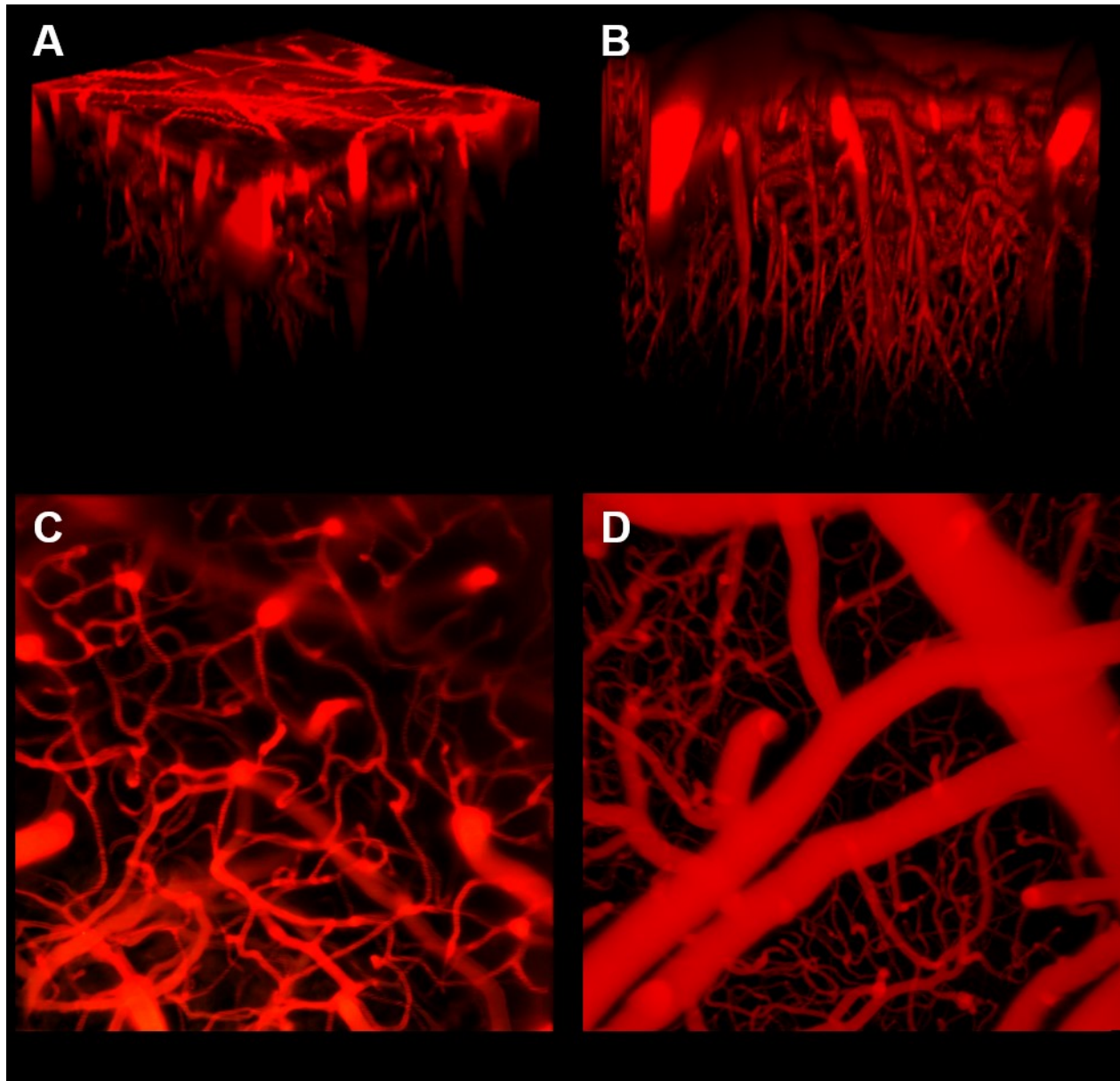


Figure 3- 31 : Image de la vascularisation de cerveau de souris en utilisant 0A-A0-PHEA sans (A, C) et avec (B, D) craniotomie.

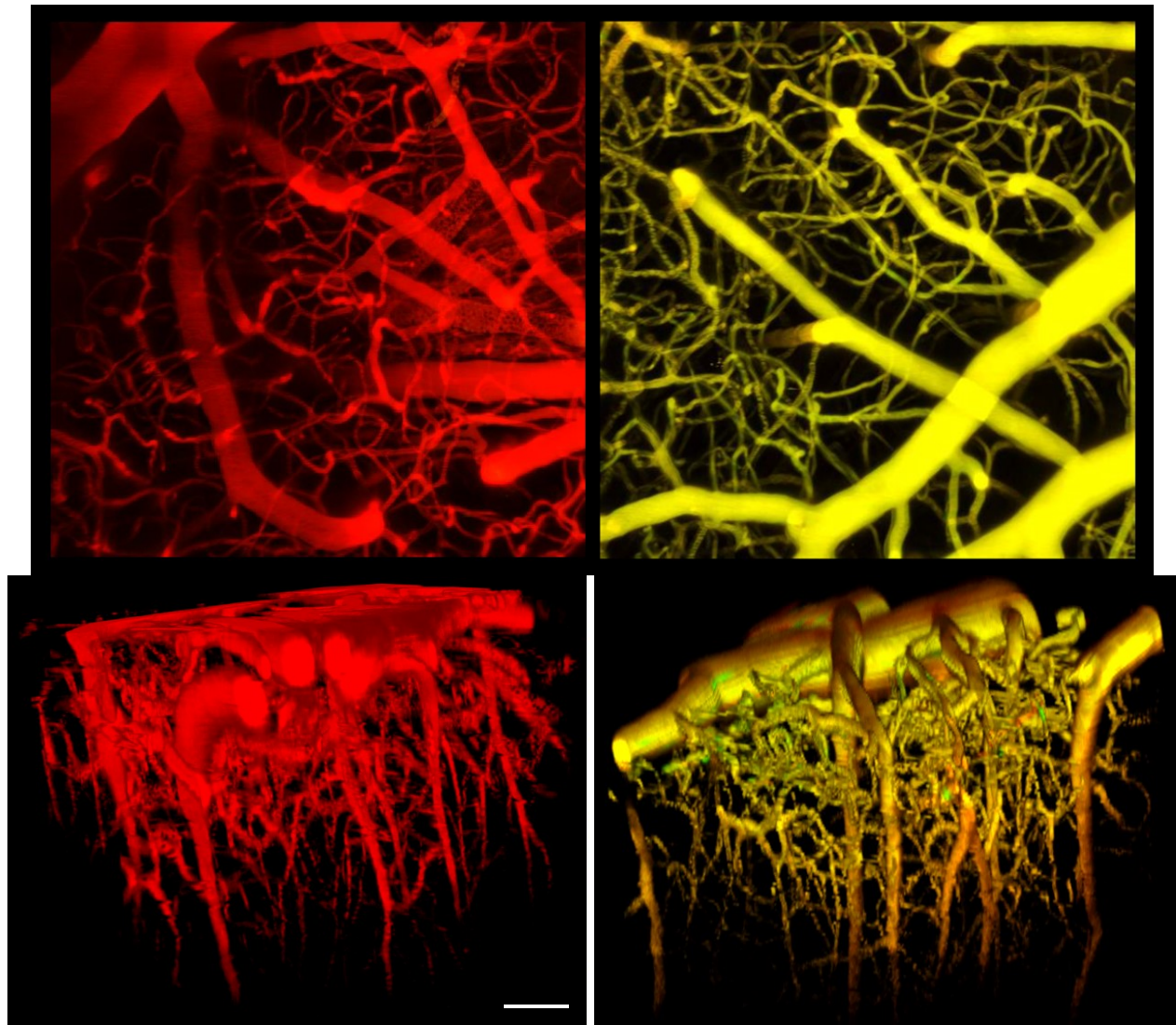


Figure 3- 32 : Comparaison 0A-A0-PHEA, 600µm de profondeur (gauche) et 0A0-PHEA, 450µm de profondeur (droite).

IV.3) Marquages des cellules endothéliales

Une persistance du marquage de la vascularisation sur une durée plusieurs jours après l'injection est observée, ce qui est extrêmement inhabituel.

Des expériences complémentaires ont donc été réalisées afin de vérifier si le colorant circulait toujours réellement dans les vaisseaux sanguins. Le FITC-dextran, sonde présentant une luminescence verte, a ainsi été utilisé comme marqueur complémentaire du plasma sanguin. Des expériences avec le FITC-dextran injecté 2 heures après la première injection de **0A-A0-PHEA** montre qu'il n'y a pas de superposition de ces deux marqueurs (Figure 3- 33) et que seul FITC dextran contribue à la luminescence de la lumière (partie circulante) des vaisseaux sanguins. De

manière tout à fait inattendue, il apparaît donc que **0A-A0-PHEA** ne circule déjà plus au bout de deux heures dans les vaisseaux sanguins, et s'est sélectivement accumulé au niveau des cellules endothéliales vasculaires (plus vraisemblablement dans leurs membranes). Cette propriété peut être reliée au caractère lipophile du chromophore, résultant de l'allongement de sa structure carbonée, qui pourrait faciliter la pénétration dans les membranes cellulaires. De manière remarquable, la fluorescence persiste dans l'endothélium pendant au moins sept jours. **0A-A0-PHEA** peut être qualifié de chromophore « intelligent » car il vient se fixer sur une zone spécifique que sont les cellules endothéliales, une propriété à notre connaissance inédite dans les sondes habituellement utilisées en angiographie.

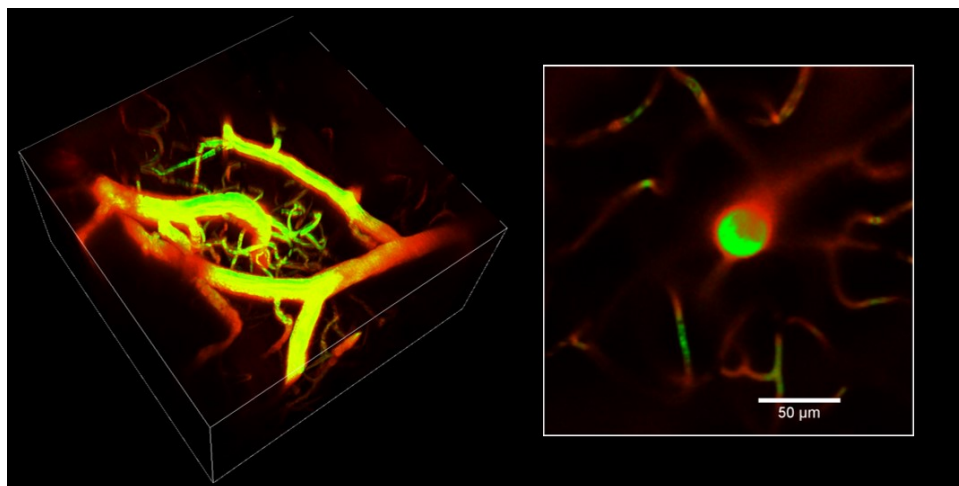


Figure 3- 33 : Mise en évidence de la localisation du **0A-A0-PHEA** sur les parois des vaisseaux sanguins (rouge) et du FITC-dextran (vert) dans le plasma sanguin (gauche), et de la non superposition des deux marqueurs sur une coupe de vaisseau (droite).

Cette propriété de fixation peut être avantageusement utilisée dans le contexte d'analyses histologiques *ex vivo*. Afin d'illustrer cette possibilité, le cerveau d'une souris, après expérience et mise à mort, est retiré et incubé dans du PFA 4%. Des couches fines de cerveau après fixation ont été visualisées par TPLSFM. Les résultats montrent que la fluorescence de **0A-A0-PHEA** est toujours détectée dans la vascularisation cérébrale, ce qui confirme sa fixation dans l'endothélium du système vasculaire. Cette luminescence reste stable même après traitement chimique des tissus. Un exemple d'immunodétection combinée des vaisseaux sanguins et des neurones est illustré Figure 3- 34. Les neurones sont marqués par l'anticorps anti-Neuronal Class III β -Tubulin (1:500, Covance) dans 1% FCS-PBST détecté par un anticorps secondaire fluorescent (anti-mouse FITC-conjugated).

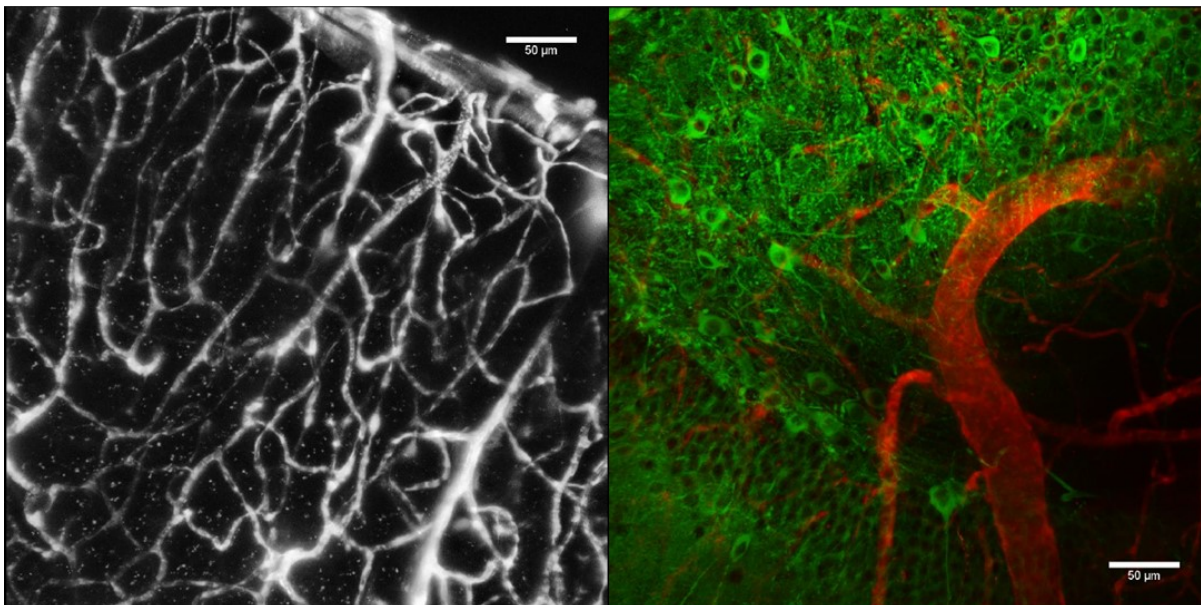


Figure 3- 34 : Immuno-détection ex-vivo : visualisation de la vascularisation cérébrale (gauche), co-marquage en vert des neurones et en rouge du système sanguin (droite).

Les propriétés de ce chromophore apparaissent dans ce contexte très prometteur pour des expériences *ex vivo* et *in vivo* d'immuno marquage. Cependant, ce marquage cellulaire pourrait être une limitation pour des études d'angiographie où l'élimination à long terme du chromophore par l'organisme est généralement souhaitée. Nous nous sommes néanmoins intéressés à ces mécanismes d'élimination.

IV.4) Métabolisation du colorant par l'organisme

Après les expériences, les souris sont sacrifiées et les organes « clés » (foie, rein, rate,...) sont étudiés *ex vivo* par microscopie de fluorescence, afin de détecter d'éventuelles traces d'accumulation du fluorophore. Des analyses comparatives ont été réalisées sur le rein et le foie des souris sacrifiées à 2h, 10h et 7 jours après injection. Au bout de deux heures **0A-A0-PHEA** semble suivre un chemin classique de métabolisation rénale, avec un marquage homogène des tubules. L'étude du rein montre néanmoins l'apparition d'agrégats dans les tubules dès 20h après injection. Ces agrégats sont toujours détectés après sept jours de délai. La taille des agrégats observés varie de $0,5 \mu\text{m}^3$ à $150 \mu\text{m}^3$. Ces agrégats semblent localisés dans une organelle des cellules rénales (peut être les lysosomes) mais pas dans les noyaux où aucun co-marquage avec Hoechst n'est observé (Figure 3- 35). Aucun marquage vasculaire ne subsiste dans le rein, ce qui

semble indiquer que le marquage des cellules vasculaires endothéliales n'intervient pas dans tous les compartiments biologiques.

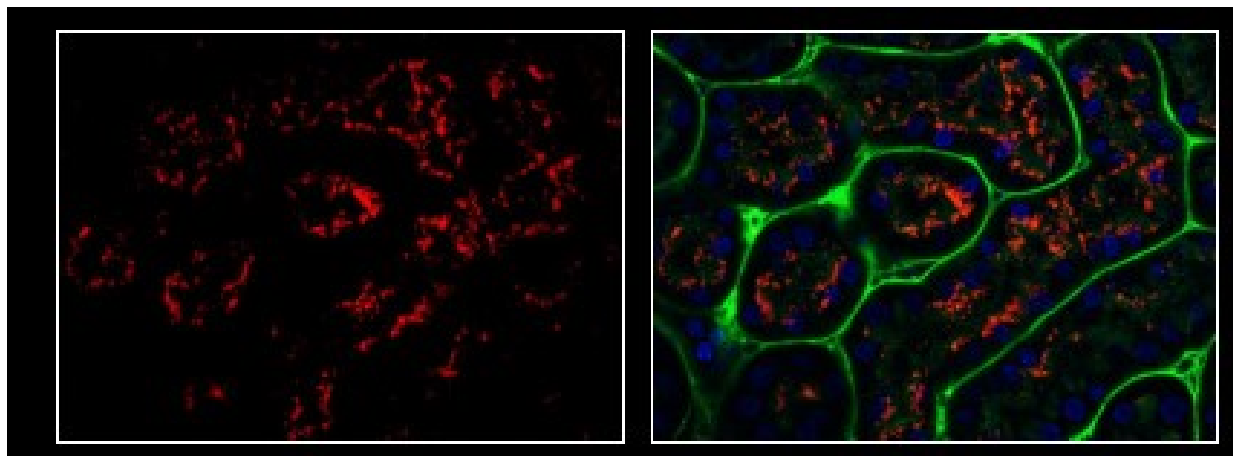


Figure 3- 35 : Coupe de rein : fluorescence des agrégats de 0A-A0-PHEA (gauche), avec le marquage des noyaux par Hoechst et de la vascularisation par FITC-Dextran (droite).

L'étude du foie montre un marquage vasculaire et la présence d'agrégats de $0,05 \mu\text{m}^3$ à $25 \mu\text{m}^3$ assez similaires à ceux observées dans les cellules rénales et dans les lysosomes des hépatocytes (Figure 3- 36). Comme dans le rein, leur présence est détectée dès 20 heures après injection et ils restent observables au bout de sept jours. La présence de ces agrégats pourrait augurer un caractère toxique à long terme de **0A-A0-PHEA** pour le foie et le rein, ce qui pourrait constituer un frein pour une application du colorant dans des protocoles cliniques.

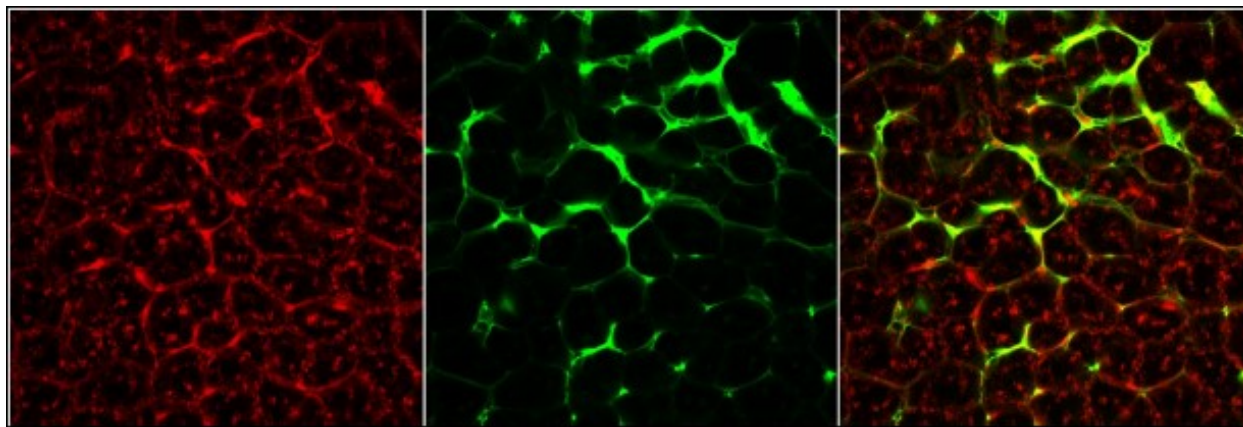


Figure 3- 36 : coupe de foie : fluorescence des agrégats et de la vascularisation sanguine par 0A-A0-PHEA (gauche), marquage de la vascularisation par FITC-Dextran (centre), superposition (droite).

Cette étude nous a néanmoins permis de valider une approche d'ingénierie moléculaire pour permettre le décalage d'émission vers le rouge. Une étude comparée d'un des fluorophores synthétisés sous forme hydrosoluble (**0A-A0-PHEA**) avec un composé modèle **0A0-PHEA**, a clairement démontré le bénéfice d'un décalage de la bande d'émission vers le rouge pour des

applications en angiographie. Ce colorant a permis de visualiser la micro vascularisation cérébrale in-vivo de cerveaux de souris sans réalisation de craniotomie, ce qui constitue un résultat brut extrêmement satisfaisant. L'observation du marquage des cellules vasculaires endothéliales permet d'envisager l'utilisation de ce chromophore dans des protocoles d'histoimmunologie, comme illustré dans la suite de ce chapitre.

V Imagerie cérébrale : étude de la vascularisation et cancer

V.1) Microscopie de fluorescence

V.1.a) Etat de l'art de l'observation de la néo-angiogenèse

L'étude des processus de vascularisation des tumeurs (néo-angiogenèse) est indispensable pour comprendre les phénomènes de dissémination des cellules cancéreuses[284]. L'imagerie de fluorescence permet de suivre l'évolution du système vasculaire après inclusion de cellules cancéreuses dans de petits animaux. Des études des tumeurs de souris dont la vascularisation est observée à un photon ont été réalisées. Le FITC-dextran a notamment été utilisé[285][286], les comparaisons avec d'autres techniques d'imagerie optique montre que la microscopie de fluorescence confocale (à un photon FITC-dextran) est plus avantageuse pour étudier la micro-vascularisation[258]. La reconstitution 3D permet de caractériser l'environnement d'une tumeur. La résolution de cette technique reste néanmoins limitée et la profondeur accessible est faible. La non fonctionnalisation des vaisseaux n'est repérée que par une absence de détection.

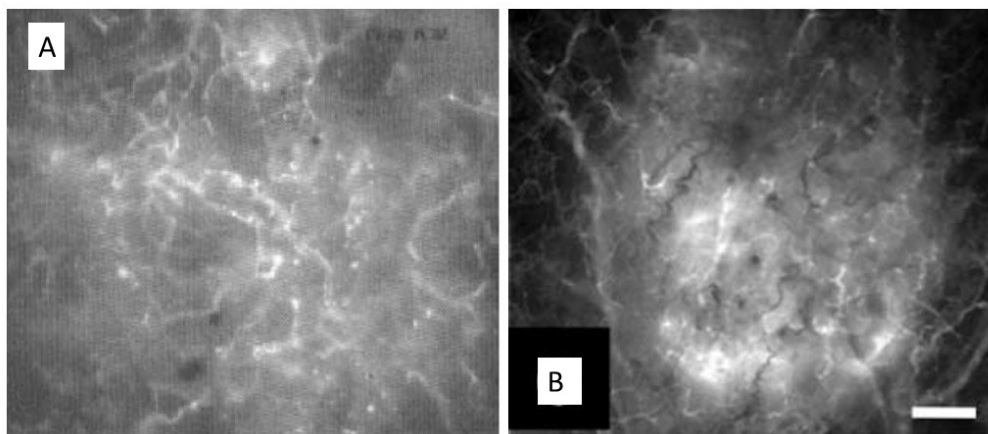


Figure 3- 37 : Image de tumeur en utilisant le FITC-dextran par microscopie à un photon.

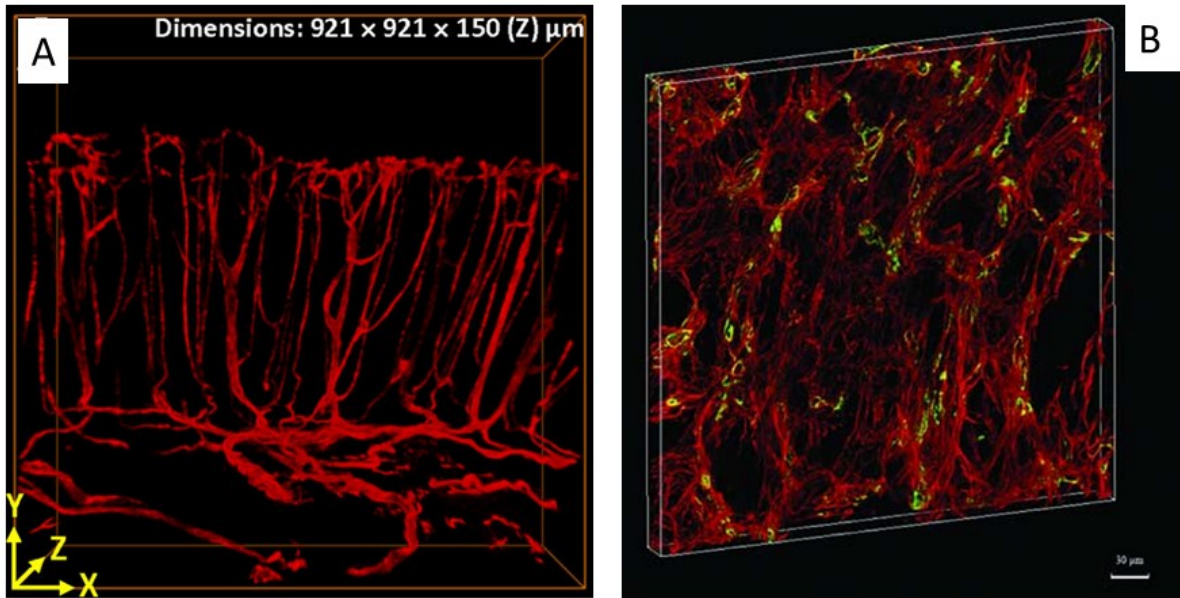


Figure 3- 38 : Exemple de visualisation sanguine. a) tissu de cellules colorectales cancéreuses, b) mélanome du foie.

Afin de pallier ces limitations, des protocoles d'études par TPLSFM ont été développés[287-289]. Des protocoles de comparaisons de QD's fluorescents en TPLSFM avec l'IRM montrent l'intérêt de la microscopie de fluorescence TPLSFM[290]. Des études comparables ont été réalisées avec la Rhodamine-dextran *in vivo* via craniotomie ou utilisation de fenêtre dorsale[277, 291, 292]. Ces études peuvent aussi être réalisées par l'utilisation d'anticorps fluorescents et de nanoparticules permettant de suivre l'angiogenèse chez des souris[293].

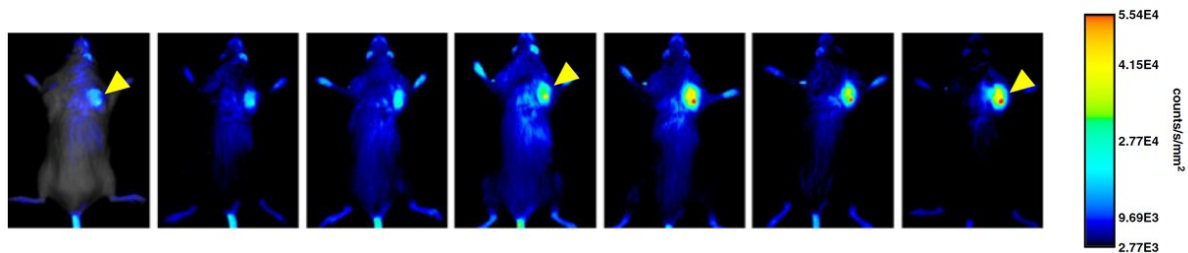


Figure 3- 39 : Evolution de la localisation d'une nanoparticule en cours du temps avec accumulation au sein d'une tumeur. Ces études sont importantes pour comprendre le développement des cellules tumorales mais aussi pour tester l'efficacité de nouveaux traitements anti-néoangiogenèse. Cependant les résolutions restent faibles et les études *ex vivo* sont nécessaires. Divers protocoles de marquage de la vascularisation par des composés fluorescents existent, mais dans l'immense majorité des cas, ce marquage intervient post-mortem, ce qui impose des limitations multiples. Dans ce contexte **0A-A0-PHEA** présente le grand avantage de pouvoir être administré *in vivo*, et de présenter un

marquage qui subsiste une fois l'organe extrait, ce qui en fait une sonde potentiellement très compétitive pour ce type d'applications.

V.1.b) Projet dans le contexte IRM

Les propriétés de **0A-A0-PHEA** ont permis d'envisager d'en faire à la fois un outil de visualisation fin de la microvascularisation *post mortem*, qui viendrait en complément d'imageries IRM moins résolues, mais pouvant intervenir *in vivo*. La résolution de l'IRM est parfois insuffisante pour la détection de petites tumeurs, à fortiori pour l'étude de micro-vascularisations comme nous l'avons vu en introduction à ce chapitre. Une possible voie d'amélioration de cette résolution passe par un travail sur les séquences impulsionnelles et le traitement numérique des données qui permettent d'améliorer le contraste. Dans le cadre du développement de nouvelles séquences impulsionnelles, il est important d'avoir une technique comparative donnant accès à une observation de meilleures résolutions pour comprendre les observations IRM. On peut voir sur la Figure 3- 40 la différence entre IRM anatomique et la technique qui sera utilisée pour les comparaisons au cours de ce chapitre qui permet de déterminer le volume sanguin. Cette méthode, nommée RSST₁ permet de quantifier d'une manière absolue le volume sanguin dans la tumeur en présence de l'extravasation de l'agent de contraste Gd-DOTA[294, 295].

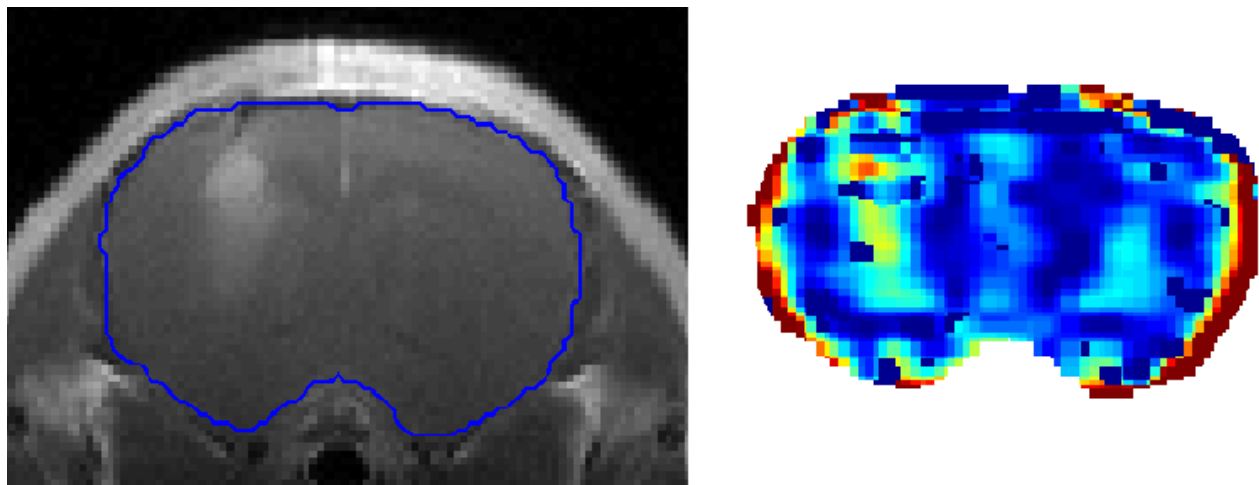


Figure 3- 40 : Comparaison d'une IRM anatomique et de la cartographie du volume sanguin obtenu par IRM-RSST₁.

V.2) Utilisation de 0A-A0-PHEA comme référence pour l'IRM

V.2.a) Imagerie de fluorescence

0A-A0-PHEA a été utilisé pour marquer le cerveau de souris, où une tumeur (U87) a été inoculée, afin de servir comme référence à des comparaisons d'expériences IRM. Après acquisition des données IRM grâce à un agent de contraste, **0A-A0-PHEA** (200* μ L, c=5 mg/mL) a été injecté pour pouvoir faire une « photographie » de la vascularisation sanguine cérébrale via le marquage des cellules endothéliales. La souris a alors été sacrifiée au bout de deux heures de circulation. Le cerveau a été immédiatement prélevé et fixé par immersion dans une solution de PFA à 4 % à température ambiante pendant 24H, suivant un protocole similaire à celui utilisé avec les souris saines. Après 3 lavages consécutifs au PBS, le cerveau a été découpé en sections de 300 μ m d'épaisseur à l'aide d'un vibratome.

Les images de chaque coupe ont ensuite été réalisées avec un microscope biphotonique, sur la totalité de la profondeur imageable (environ 150 μ m). La profondeur est ici moins importante à cause de l'utilisation d'un laser et de détecteurs moins performants. La taille du champ est d'environ 600 μ m x 600 μ m, il est nécessaire, pour avoir une vue d'ensemble de la coupe, de recomposer les images en mosaïque afin de reconstituer une image de la coupe globale. L'image de la tranche de cerveau en trois dimensions peut alors être reconstruite. Les images obtenues montrent la microvascularisation cérébrale avec une résolution exceptionnelle, permettant la visualisation des réseaux de microvascularisation de tumeurs cérébrales primaires et secondaires avec une très grande précision (Figure 3- 41). La reconstitution du cerveau peut être obtenue par addition de différentes coupes. Un exemple d'épaisseur de coupe est visualisée Figure 3- 42. Il est alors possible d'additionner la fluorescence émanant de l'ensemble des plans pour réaliser des images de contraste de flux sanguin (Figure 3- 43). Ces images sont utilisables pour faire une comparaison directe avec les images de flux sanguin obtenues par IRM.

Au vu de la remarquable qualité des images obtenues, **0A-A0-PHEA** se positionne comme un candidat extrêmement prometteur pour imager la microvascularisation au niveau des tumeurs. Il permet d'obtenir *post mortem* des infos quantitatives (volume de flux sanguin) sur les processus

vasculaires en place au sein de la tumeur, tels son approvisionnement en nutriments ou les mécanismes de dissémination.

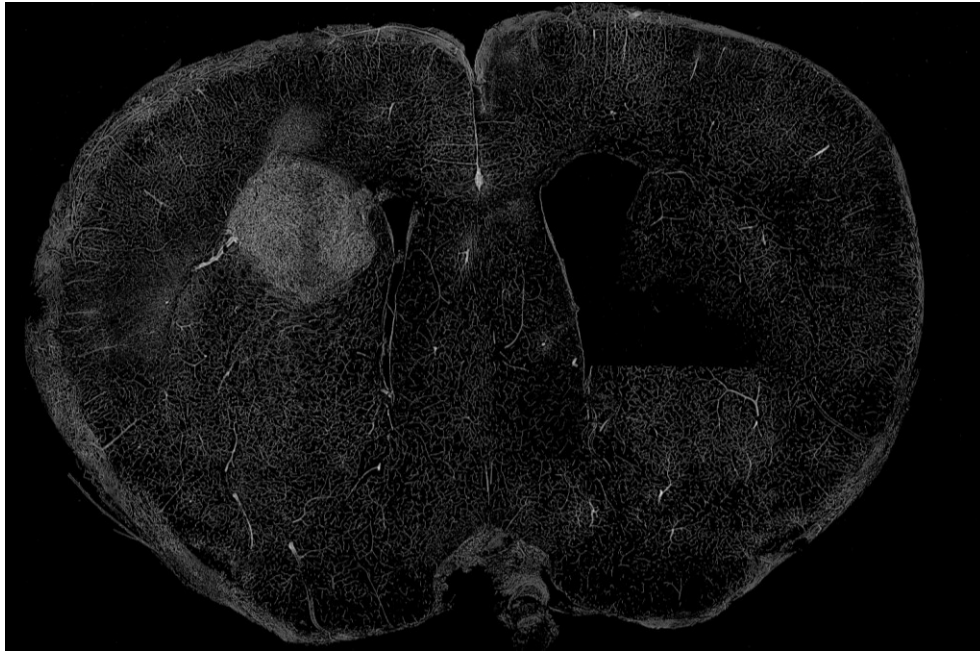


Figure 3- 41 : micro-vascularisation d'une tranche de cerveau de souris obtenue par TPLSFM grâce à 0A-A0-PHEA.

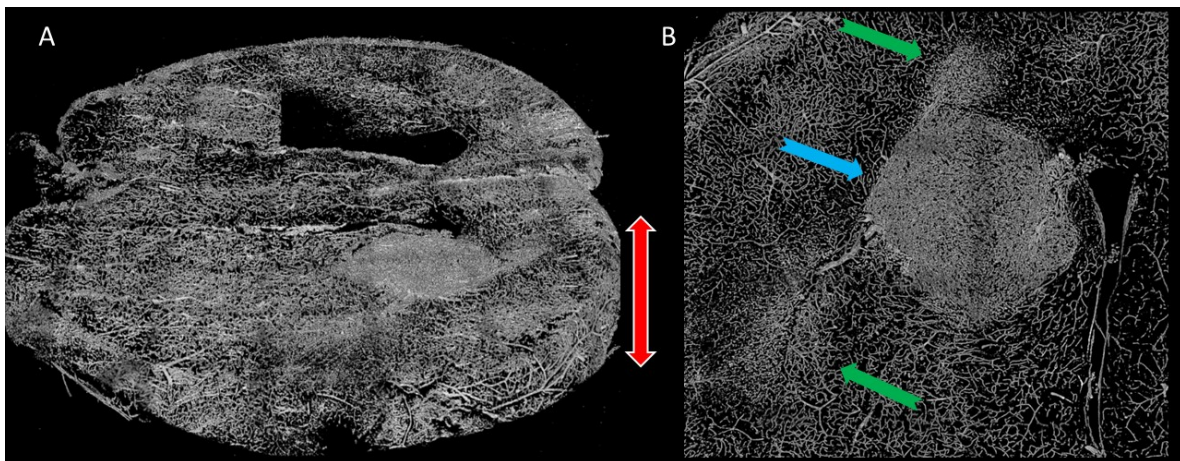


Figure 3- 42 :a) reconstitution d'une tranche de cerveau (200 µm), b) tumeur principale (bleu), métastase (verte).

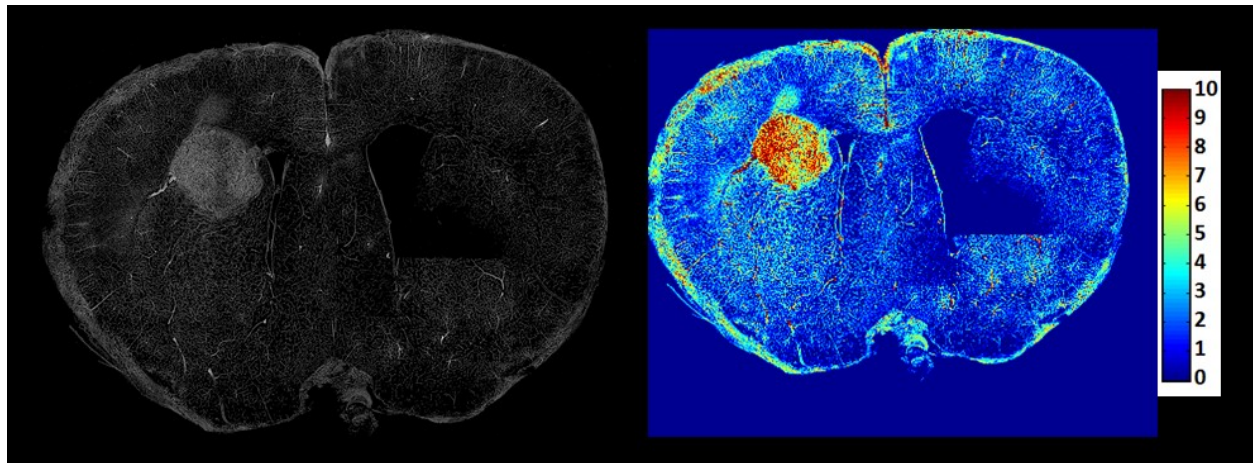


Figure 3- 43 : Image brute du marquage vasculaire : cellules endothéliales (gauche) et volume sanguin (droite).

Par exemple, la croissance de la tumeur via la production de métastases périphériques est visible sur nos images, alors qu'elle n'apparaît pas sur les images IRM (Figure 3- 42_B). Nous allons maintenant voir comment le flux sanguin est calculé et faire une comparaison avec la méthode IRM $RRST_1$.

V.2.b) Comparaison avec l'IRM

Des études préliminaires ont été réalisées avec des complexes de gadolinium injectés *in vivo* dont l'IRM a été réalisée par la méthode $RSST_1$. Pour comparer les données obtenues par fluorescence avec l'IRM, il faut obtenir une image du volume sanguin. La méthodologie appliquée pour obtenir une image du volume sanguin est la suivante :

Une segmentation par classification est réalisée sur l'ensemble des images, afin de distinguer les objets d'intérêts (vascularisation) du fond. L'ensemble des calculs est réalisé sur les images segmentées. Un volume vasculaire est ensuite calculé localement selon une taille de grille d'analyse variable (pour que la comparaison avec l'IRM soit plus facile, car dans ce cas la taille réelle d'un voxel est 1 mm x 1 mm x 1 mm, alors qu'en biphoton elle est de 1,17 μm x 1,17 μm x 1,4 μm). Le volume sanguin est obtenu en divisant la somme de toutes les surfaces des objets segmentés (vaisseaux sanguins) dans une maille de grille par le volume de la zone d'analyse (surface de la maille x volume de la pile d'image). Une cartographie complète du cerveau est ensuite reconstituée, chaque pixel correspond à une maille de la grille d'analyse dont l'intensité reflète directement le volume vasculaire local. Le volume vasculaire reporté est compris entre 0 et 10%.

Il est alors possible de comparer le volume sanguin obtenu par la méthode IRM et celui obtenu par fluorescence, comme le montre la Figure 3- 44. Cette figure montre clairement la différence de résolution entre les deux méthodes.

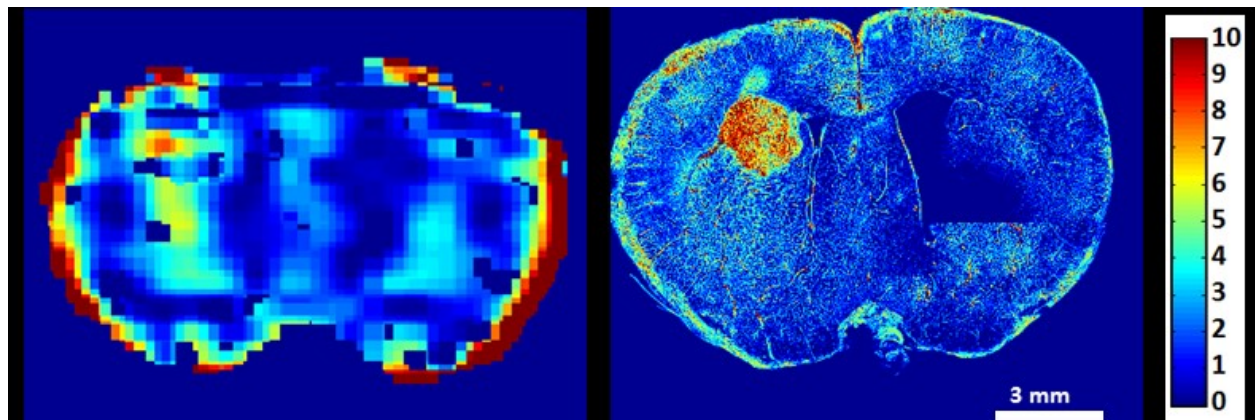


Figure 3- 44 : Comparaison du volume sanguin obtenu par IRM (gauche) et par TPLSFM (droite).

Des expériences comparatives ont aussi été effectuées sur une souris ayant reçu un traitement anticancéreux. La souris est traitée par le Bevacizumab à raison d'une injection de 10 mg/kg douze jours après occlusion de la tumeur. La Figure 3- 45 représente la cartographie du volume sanguin cérébral chez une souris présentant une tumeur U87 trente jours après son occlusion. Le marqueur **0A-A0-PHEA** a été introduit deux heures avant la mise à mort de la souris. Ces cartographies montrent la possibilité d'imager après traitement. Cependant, pour suivre les évolutions de fonctionnalité des vaisseaux, il serait intéressant de visualiser le système sanguin avant et après traitement sur une même tumeur. Ce constat nous a amené à envisager la synthèse de marqueurs complémentaires, qui vont être présentés en conclusion de ce chapitre.

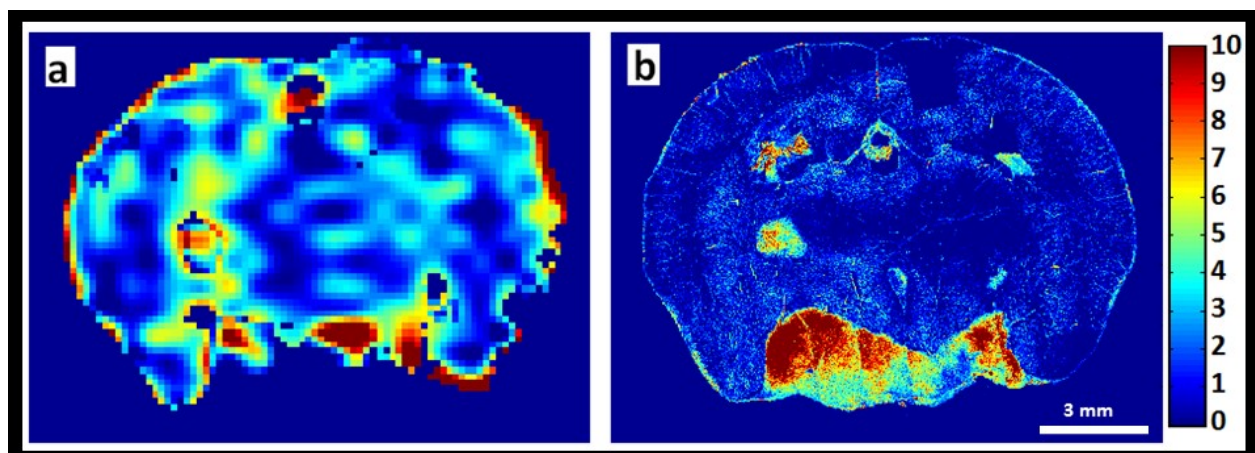


Figure 3- 45 (a) méthode RSST₁ par IRM en in vivo, (b) microscopie bi-photon en ex vivo.

VI Suivis de traitement en oncologie

VI.1) Principe

0A-A0-PHEA permet d'imager le système vasculaire de la souris et de déterminer le volume sanguin. Cependant, dans un cadre de suivi du traitement d'une tumeur cérébrale, il faut pouvoir marquer les vaisseaux sanguins avant et après ce dernier afin d'en mesurer les changements[277, 293]. Le principe est de faire une injection, chez une souris où une tumeur cérébrale a été inoculée, d'un premier chromophore venant marquer les parois des vaisseaux sanguins (**0A-A0-PHEA** par exemple). Ensuite un traitement anti-cancéreux est administré à la souris et on laisse agir quelques jours. Enfin, avant de sacrifier la souris, une deuxième injection d'un second chromophore sera réalisée pour réaliser un co-marquage de vaisseaux. Ce co-marquage permettra de voir quels vaisseaux sanguins ont été impactés par le traitement. La vascularisation ayant été partiellement détruite sera uniquement détectée par le marqueur 1. La nouvelle vascularisation sera quant à elle uniquement marquée par le marqueur 2. Pour réaliser cette étude, il faut proposer une nouvelle sonde possédant les mêmes caractéristiques de marquage de cellules endothéliales mais émettant dans une zone spectrale différente.

Le traitement utilisé au cours de cette étude sera le bevacizumab[296-298]. Les propriétés de diffusion à travers les vaisseaux sanguins sont primordiales pour pouvoir garder une bonne résolution tout en laissant le traitement agir pendant le temps imparti. Moins le colorant diffusera à travers les parois, plus le traitement pourra être suivi sur de longues durées. Au cours des observations préliminaires pour **0A-A0-PHEA**, une légère diffusion a été observée 12 jours après injection. De ce point de vue il semble intéressant de développer des sondes plus lipophiles pour limiter la diffusion, ce qui nécessite la synthèse de nouvelles sondes dont les caractéristiques sont les suivantes :

- longueur d'onde d'émission différente d'**0A-A0-PHEA** pour pouvoir collecter les émissions dans des canaux différents. La longueur d'onde n'est pas nécessairement dans la zone de transparence biologique car il s'agit d'études *ex vivo*,
- sélectivité dans le marquage des cellules endothéliales avec une diffusion aussi limitée que possible après fixation,
- bonnes propriétés d'absorption à deux photons (λ_{max}^{TPA} dans la fenêtre de transparence biologique, σ_{TPA} élevée).

VI.2) Synthèse de nouvelles sondes

Sur la base de ce cahier des charges, deux nouvelles familles de sondes ont été proposées. Le principe consiste à synthétiser des sondes où les groupements anthracènes sont remplacés par d'autres groupements aromatiques, afin d'obtenir des énergies d'émission variables. Les molécules synthétisées dans l'étude d'ingénierie moléculaire du début de ce chapitre, correspondent aux critères spectroscopiques requis. Les cœurs fluorènes représentent les avantages souhaités. Ils possèdent une lipophilie supérieure à celle des groupements phényles, résultant principalement des substituants alkyles sur la position 9. Cette lipophilie peut permettre d'envisager des interactions encore plus marquées avec les cellules endothéliales et de limiter les phénomènes de diffusion. Les différents schémas de synthèse des sondes polymères à partir des précurseurs acétates sont présentés respectivement Figure 3- 46 : Synthèse de **0P-P0-PHEA**. Figure 3- 46 pour **0P-P0-PHEA** et Figure 3- 47 pour **0F-F0-PHEA**.

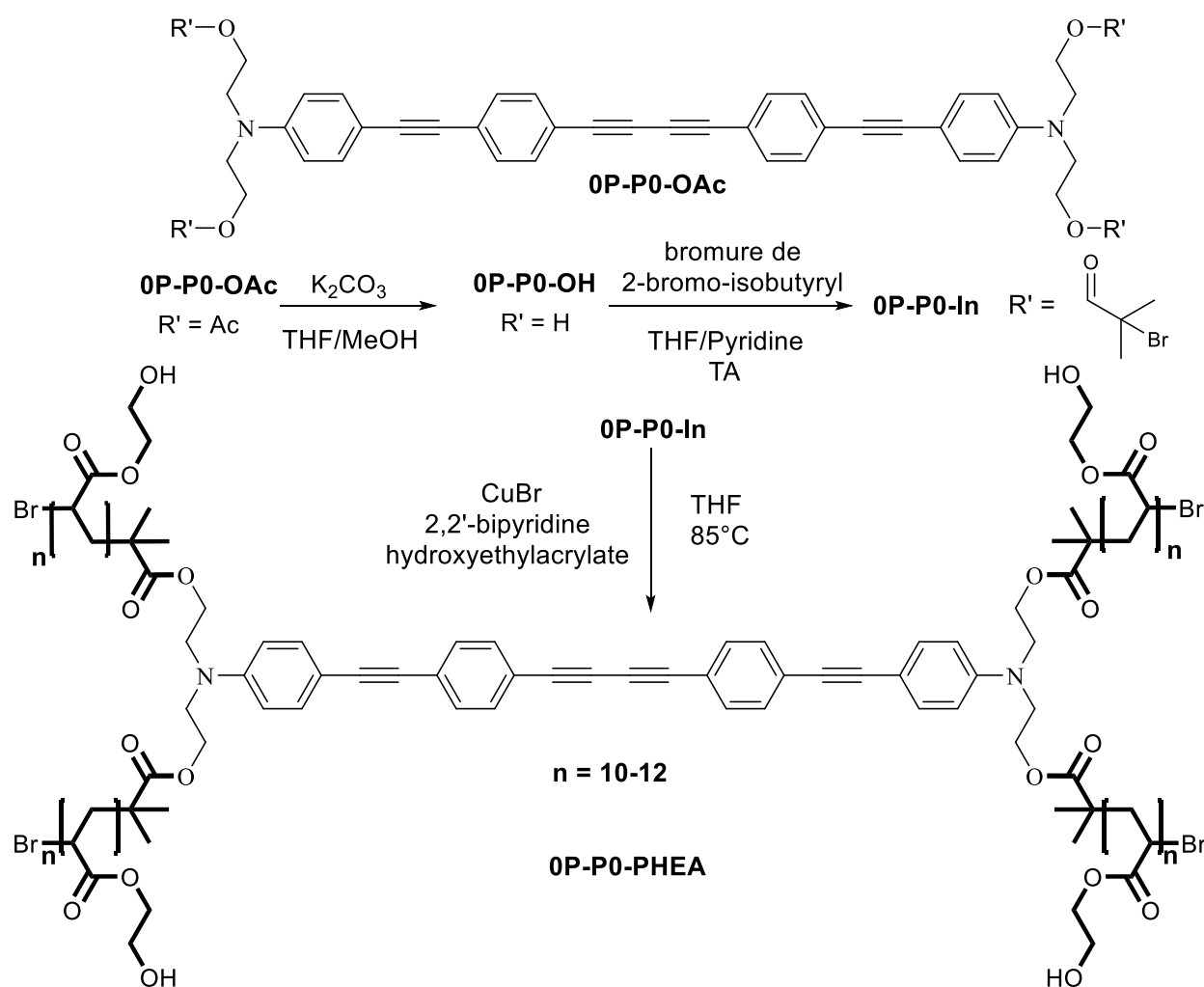


Figure 3- 46 : Synthèse de **0P-P0-PHEA**.

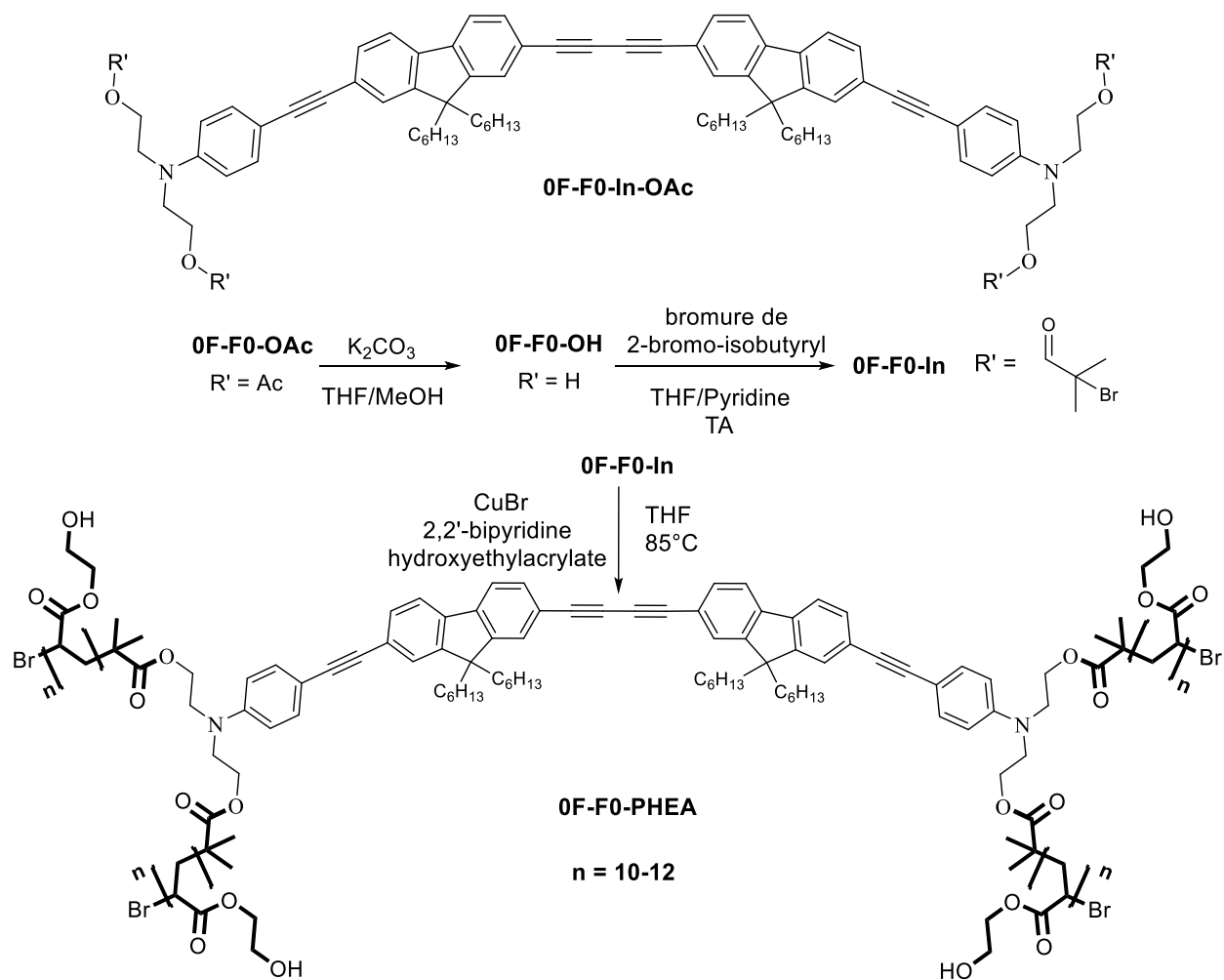


Figure 3- 47 : Obtention de la sonde 0F-F0-PHEA.

VI.3) Caractérisations des nouvelles sondes en milieu physiologique

Les propriétés spectroscopiques et de solubilités du nouveau **0A0-PHEA** ($n=5-6$) ne sont pas reportées ici et sont superposables à celle de **0A0-PHEA** ($n=13-15$)[224].

VI.3.a) Solubilité :

Dans un premier temps la solubilité des polymères dans les solvants aqueux a été testée.

- **0P-P0-PHEA** a une bonne solubilité en milieu aqueux (sérum physiologique) à l'instar d'**0A-A0-PHEA**. Les études in-vivo sont donc envisageables.
- **0F-F0-PHEA**, à l'inverse, n'est pas soluble dans l'eau. La présence des chaînes hexyles latérales empêche la solubilisation du chromophore dans l'eau pure. Cependant l'utilisation d'un mélange eau/DMSO (90/10) permet de solubiliser la sonde polymère à des

concentrations compatibles avec l'application cible ($>1\text{mg/mL}$). Bien que l'utilisation du DMSO ne soit pas optimale pour des applications in-vivo sur le long terme, l'utilisation de ce système de solvants permettra néanmoins une étude préliminaire du composé. En cas de résultats satisfaisants, la modulation des chaînes alkyles ou de la longueur des chaînes polymères pourra alors permettre de trouver un juste milieu entre le caractère hydrosoluble et le caractère lipophile.

VI.3.b) Solvatochromisme des dérivés PHEA :

L'ensemble des résultats spectroscopiques sont présentés Tableau 3- 5.

Pour le composé **0F-F0-PHEA**, seule une étude dans un mélange H₂O/DMSO (9/1) a été réalisée à cause des problèmes de solubilité. Dans ce mélange, **0F-F0-PHEA** a un déplacement de Stokes de 5650 cm^{-1} (Figure 3- 48). L'émission se situe autour de 487 nm, une valeur suffisamment éloignée de celle de **0A-A0-PHEA** pour permettre de différencier leurs signaux de luminescence (Figure 3- 50). Le composé possède un fort rendement quantique 67,6% ce qui compensera en partie les limites d'imagerie en profondeur induites par l'émission dans le vert, hors de la FTB.

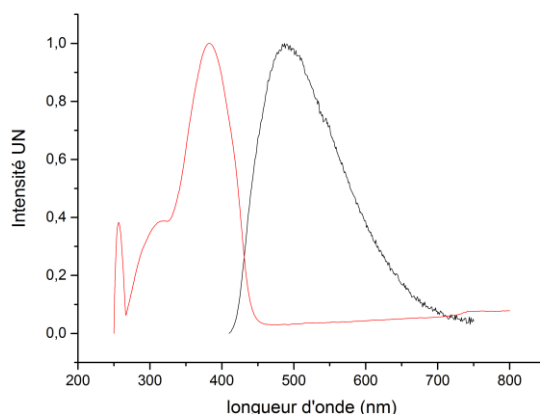


Figure 3- 48 : Absorption et émission de **0F-F0-PHEA** dans un mélange H₂O/DMSO (9/1).

Pour le composé **0P-P0-PHEA**, l'étude complète du solvatochromisme a pu être réalisée (Figure 3- 49). L'étude du solvatochromisme de **0P-P0-OAc** et **0P-P0-PHEA** amène les mêmes conclusions que celles données pour **0A-A0-In** et **0A-A0-PHEA**. On observe un solvatochromisme positif, avec une forte réorganisation à l'état excité. Les bandes d'absorption sont larges et caractéristiques d'un transfert de charge. Aucun effet tampon de la part du polymère sur la polarité du solvant n'est observé, et on obtient un solvatochromisme positif classique. Dans

l'eau, la longueur d'onde d'émission maximale est de 523 nm avec un rendement quantique de 12,7%.

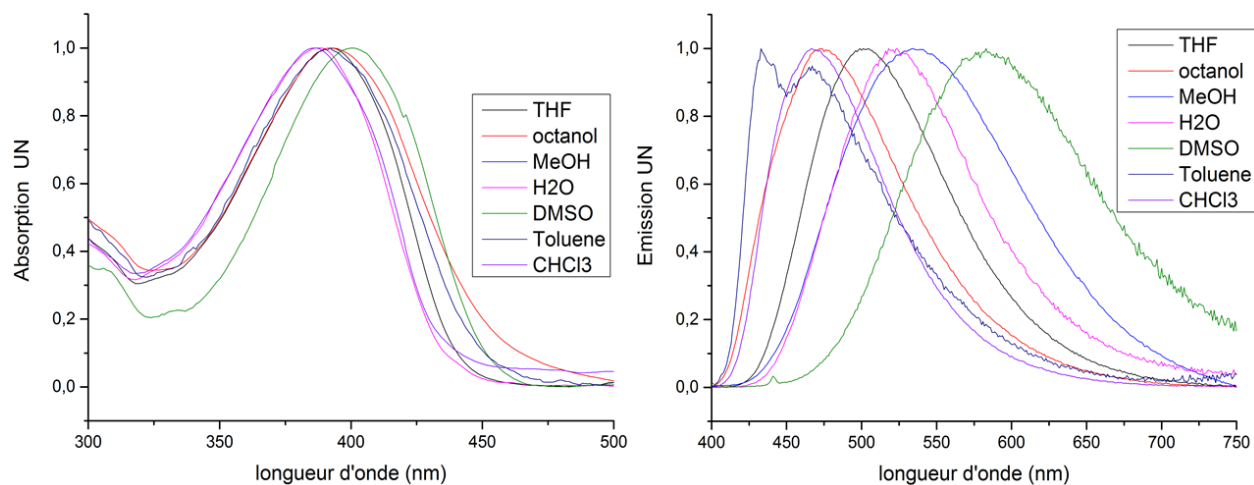


Figure 3- 49 : Solvatochromisme de 0P-P0-PHEA.

	Solvant	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	ϕ_F	σ_{TPA} (GM)	$\lambda_{\text{max}}^{TPA}$ (nm)	σ_{TPA} à 800 nm (GM)
0P-P0-PHEA	MeOH	389	534	6980	40,1			
	THF	392	499	5470	61,1			
	H ₂ O	389	523	6586	12,7	>225	>720	87
	DMSO	401	583	7785	26,8			
	CHCl ₃	386	467	4493	62,1			
	Toluène	392	433	2416	15,3			
	Octanol	392	474	4413	36,3			
0F-F0-PHEA	H ₂ O/DMSO 9/1	382	487	5644	67,6	>310	>720	

Tableau 3- 5 : Résultats spectroscopiques pour Ph2-PHEA et Flu2-PHEA.

Là encore, les propriétés spectroscopiques sont compatibles pour des expériences de co-marquage avec **0A-A0-PHEA** (Figure 3- 50).

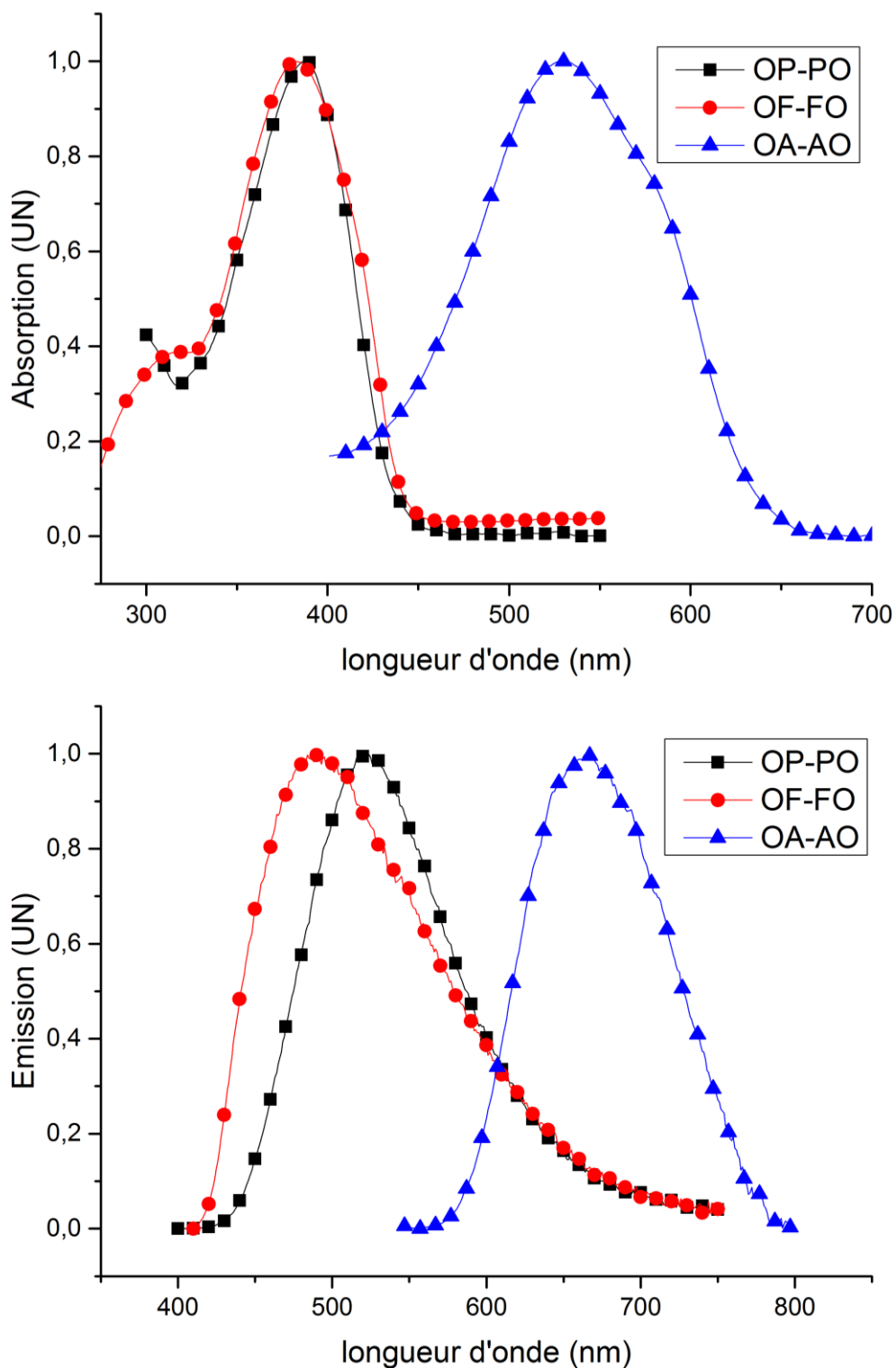


Figure 3- 50 : Comparaisons des spectres d'absorption et d'émission des trois sondes dans l'eau (H₂O/DMSO pour 0F-0F).

VI.3.c) Résultats d'absorption à deux photons

La méthode utilisée, TPIF opérant entre 700 et 900nm, ne permet pas d'avoir accès au maximum de l'absorption à deux photons. La valeur des maximums mesurés se situent à 310 GM pour 0F-

F0-PHEA (Figure 3- 51) et 225 GM pour **0P-P0-PHEA** (Figure 3- 52). Les valeurs de ces sections efficaces sont satisfaisantes, avec un maximum autour de 300 GM dans la zone investiguée.

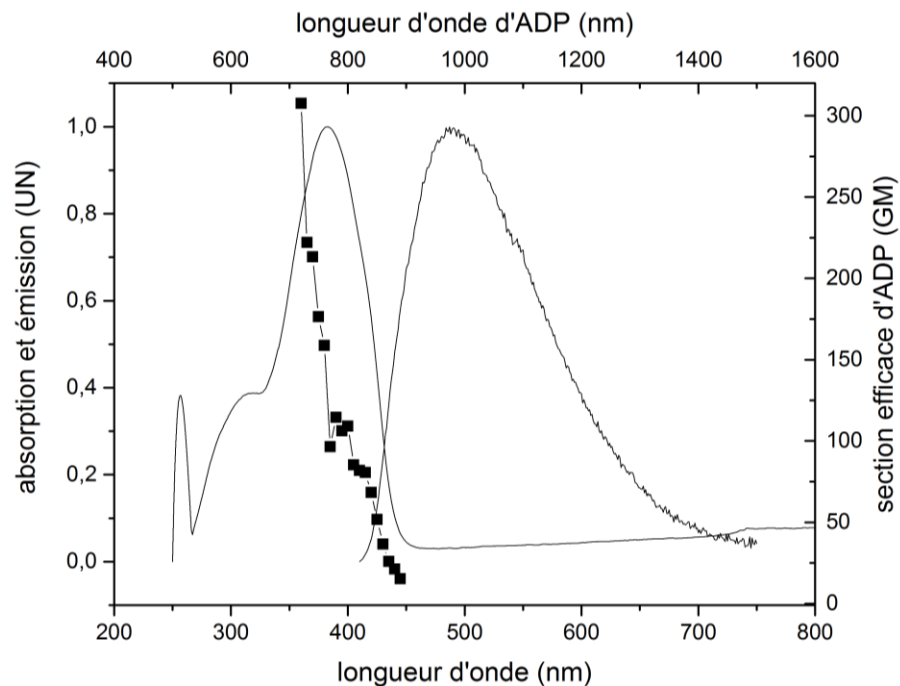


Figure 3- 51 : Propriétés spectroscopiques à un et deux photons dans un mélange H₂O/DMSO (9/1) de 0F-F0-PHEA.

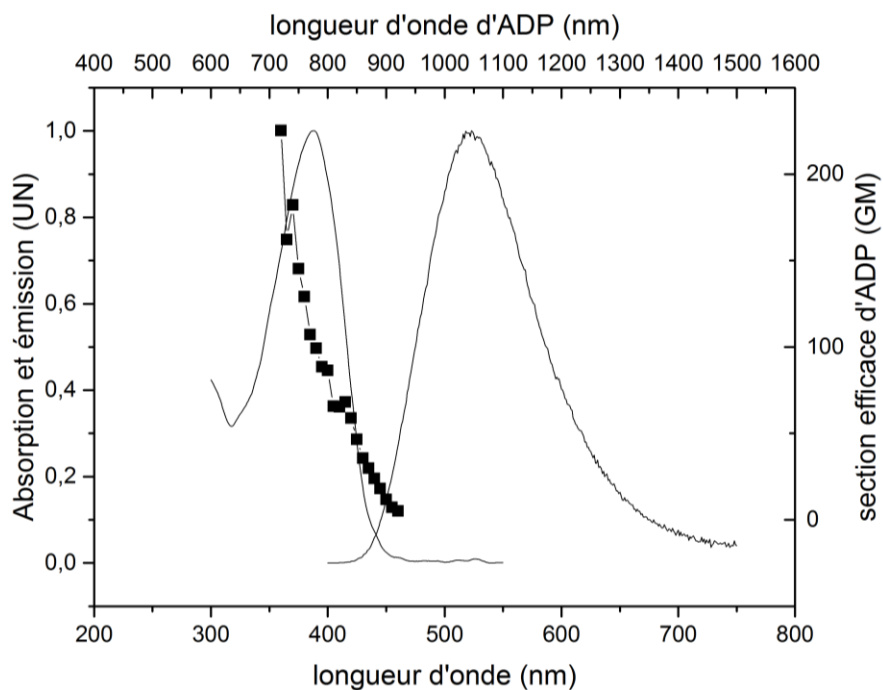


Figure 3- 52 : Propriétés spectroscopiques à un et deux photons dans l'eau de 0P-P0-PHEA.

Pour ces deux composés, une valeur de 100 GM est mesurée pour une longueur d'onde de 800 nm. Les figures de mérite à 800 nm sont donc de 67 GM pour **0F-F0-PHEA** et de 11 GM pour **0P-P0-PHEA**. Ces propriétés spectroscopiques semblent compatibles avec les expériences envisagées.

VI.4) Résultats préliminaire en microscopie de fluorescence

Des expériences préliminaires d'imagerie par microscopie intravitale de fluorescence ont été menées sur **0P-P0-PHEA** pour visualiser les vaisseaux sanguins de l'oreille d'une souris. Cette observation est beaucoup moins invasive que pour celle du cerveau et plus facile à mettre en œuvre. Elle ne nécessite pas le sacrifice de la souris après étude. La fluorescence est détectée sur le canal vert exclusivement, ce qui montre que les caractéristiques spectroscopiques de la sonde sont différentes de celles de **0A-A0-PHEA**, et qu'elle pourrait donc constituer un marqueur complémentaire à ce dernier. Des images d'angiographie ont été obtenues (Figure 3- 53). Malheureusement, aucun marquage des cellules endothéliales n'est observé. Cependant, ce résultat est préliminaire car avec **0A-A0-PHEA** il a été montré que les cellules endothéliales n'étaient pas marquées uniformément. Ainsi, elles étaient marquées dans le cerveau alors qu'aucun marquage *ex vivo* n'était observé dans le rein.

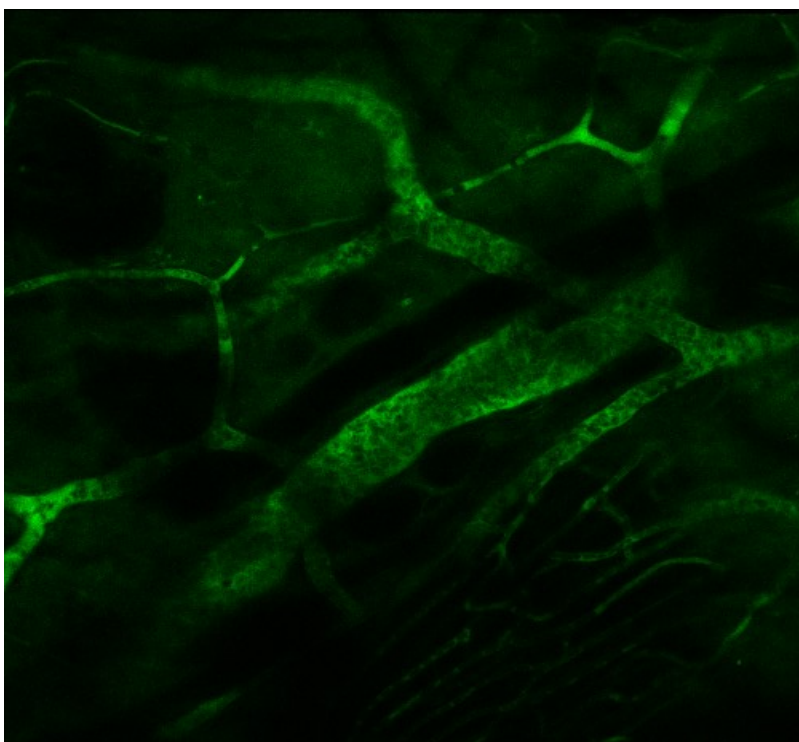


Figure 3- 53 : Microvascularisation dans une oreille de souris (marqueur **0P-P0-PHEA**).

VII Conclusion et perspective

Dans un premier temps, la stratégie d'ingénierie moléculaire présentée dans ce chapitre a permis d'obtenir des colorants aux propriétés d'absorption à deux –photons et d'émission fortement décalées vers le rouge. Le chromophore **0A-A0-OAc** dont l'émission se trouve dans la fenêtre de transparence biologique et dont le protocole de synthèse relativement simple permettait d'envisager l'obtention de quantités appréciables de matériel a été sélectionnée pour servir de sonde dans le cadre d'angiographie par microscopie de fluorescence.

0A-A0-OAc a donc été modifié via l'introduction de chaînes polymères. Les propriétés du chromophore hydrosoluble obtenu, **0A-A0-PHEA**, ont permis de réaliser l'angiographie vasculaire cérébrale *in vivo* avec des profondeurs de 400µm en absence de craniotomie.

0A-A0-PHEA est aussi un marqueur des cellules endothéliales. Ce marquage présente de nombreux avantages dans le cadre d'une utilisation en oncologie. Le marquage des vaisseaux sanguins ont ainsi permis de reconstituer une image de cerveau de souris *ex vivo* d'une qualité qui a notre connaissance n'a pas d'équivalent dans la littérature. Ces images permettent de remonter au volume sanguin et de faire des comparaisons avec la technique IRM pour détecter des tumeurs et des métastases périphériques. Des études sont toujours en cours.

Pour suivre la néangiogenèse à proximité de cellules cancéreuses, de nouvelles sondes ont été synthétisées possédant des propriétés spectroscopiques complémentaires à celles de **0A-A0-PHEA**. Le but est de réaliser des marquages de cellules endothéliales à différentes étapes d'un traitement par des marqueurs de couleurs complémentaires, afin de réaliser des photographies *in vivo* de l'évolution d'une tumeur cancéreuse. Ces nouvelles sondes doivent néanmoins être étudiées de manière plus approfondies afin de déterminer leur potentiel pour l'application cible.

De nouvelles sondes sont aussi en cours de synthèse pour garder la structure bis-anthracène tout en changeant la bande d'émission via le changement des anilines par des dérivés de résorcinols (Figure 3- 54). Des essais sur la longueur des chaînes polymères doivent aussi être réalisés pour voir si elles ne peuvent pas être mises à profit pour limiter les phénomènes de diffusion.

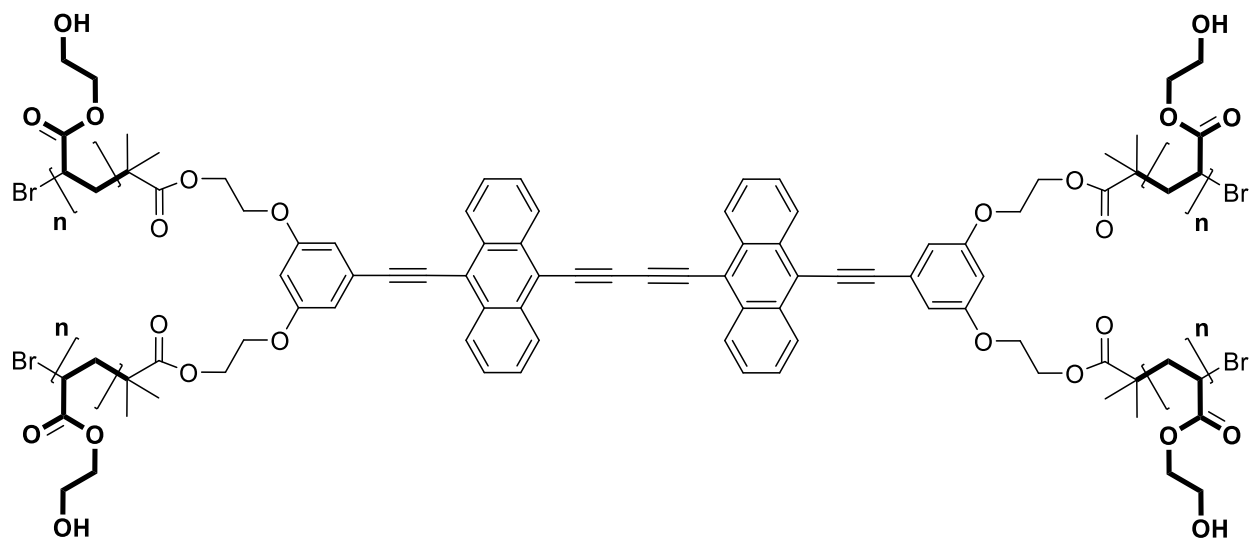


Figure 3- 54 : Structure de sonde permettant de conserver la partie lipophile centrale et le nombre de chaîne polymère tout en changeant les propriétés d'émission par rapport à Ant2-PHEA.

Chapitre 4 : Sondes **fluorescentes à deux** **photons optimisées** **pour la vectorisation** **de cellules cancéreuses** ***in vivo.***

Le but de ce chapitre est de développer une méthode de ciblage pour réaliser de l'imagerie pour faire de la PTD-ADP *in vivo*, à partir des plateformes hydrosolubles abordées au chapitre précédent. Afin de faciliter la localisation du chromophore lors des études préliminaires, nous avons choisi de travailler sur un chromophore fluorescent simple et absorbant à deux photons. Comme nous l'avons déjà évoqué dans les chapitres précédents, deux caractéristiques physico-chimiques importantes doivent être prises en compte dans le développement de sondes fluorescentes utilisables pour des applications de biophotonique. :

- L'hydro-solubilité permettant la circulation dans le sang[299-301],
- La sélectivité permettant le ciblage d'organes ou de cellules spécifiques, comme par exemple des tumeurs dans le cadre de la PTD.

Dans ce cadre, il est bien entendu avantageux d'introduire autour du chromophore des groupements qui permettent d'apporter à la fois une hydrosolubilisation et une sélectivité. Si la stratégie présentée dans le précédent chapitre s'est avérée très efficace en ce qui concerne le premier critère, elle reste assez limitée en ce qui concerne le second, puisque le colorant est dans tous les cas resté intravasculaire.

Ce chapitre est le fruit de deux collaborations, la première avec la docteur Odrun Arna Gederaas (Department of Cancer Research and Molecular Medicine, NTNU Trondheim) et le professeur Mikael Lindgren (Department of Physics, NTNU Trondheim), spécialistes en photothérapie des cancers et en biophysique. Dans le cadre de cette collaboration, j'ai pu réaliser un séjour de 20 jours à l'université de Trondheim, au cours duquel des expériences d'imagerie cellulaire ont été effectuées. Une seconde collaboration a été mise en place avec la docteur Katarzyna Matczyszyn (Institute of physical and theoretical chemistry, Wrocław University of Technology) et le professeur Marek Samoć (Institute of physical and theoretical chemistry, Wrocław University of Technology) dont le groupe a étudié les propriétés d'association entre les sondes polymères synthétisées et l'ADN. Ces études ont pour but d'expliquer les sélectivités observées pour certaines formulations du polymère utilisé, et constituent aussi une étude préliminaire à la mise en place d'une méthode alternative de vectorisation (ciblage) que nous détaillerons en fin de chapitre.

I Exemple de fonctionnalisation permettant la vectorisation.

Nous allons nous intéresser aux groupements hydrosolubilisants et induisant une sélectivité, qui peuvent être introduits sur un chromophore. Les exemples donnés sont pris parmi les chromophores absorbants à deux photons.

I.1) Les chaînes PEG

Ces groupements hydrosolubilisants sont très utilisés[302]. Ils possèdent un caractère lipophile qui peut permettre dans certaine structure de faire l'imagerie de la membrane[303] et du cytoplasme[304] (Figure 4- 1, Figure 4- 2).

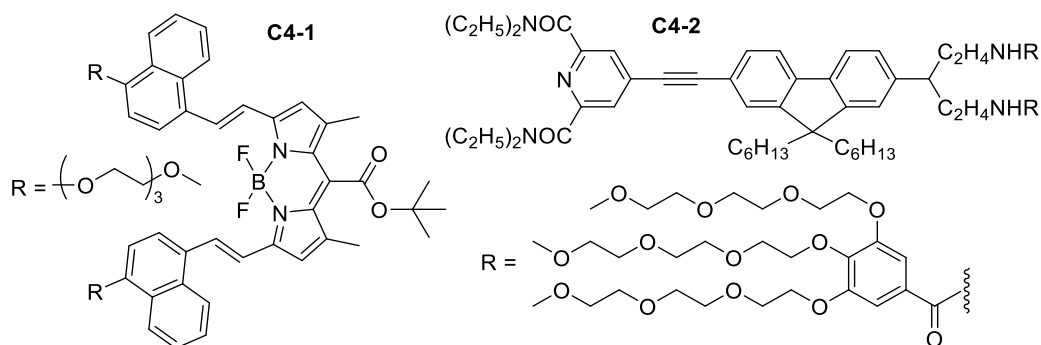


Figure 4- 1 : Exemple de chromophore absorbant à deux photons portant des chaînes PEG.

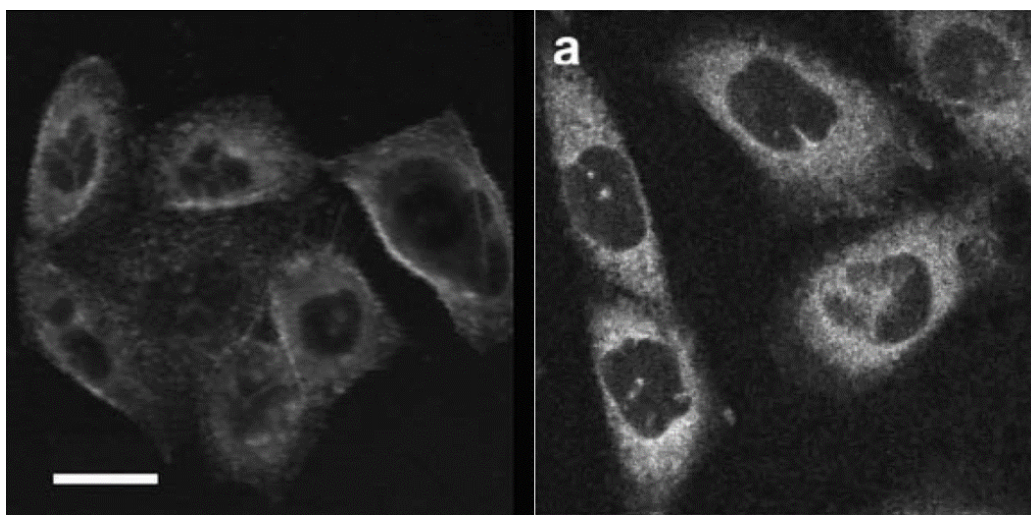


Figure 4- 2 : Exemple de marquage de la membrane cellulaire (C4-1) et du cytoplasme (C4-2).

I.2) Groupe cationique :

On peut citer comme groupement cationique les groupements pyridinium, imidazolium, phosphonium. La charge permet d'augmenter la solubilité en solvant aqueux. Les groupements cationiques, permettent d'optimiser la perméation des molécules au travers des membranes biologiques[305], et peuvent par ailleurs faciliter les interactions avec certaines molécules comme l'ADN, ARN [306, 307](Figure 4- 3).

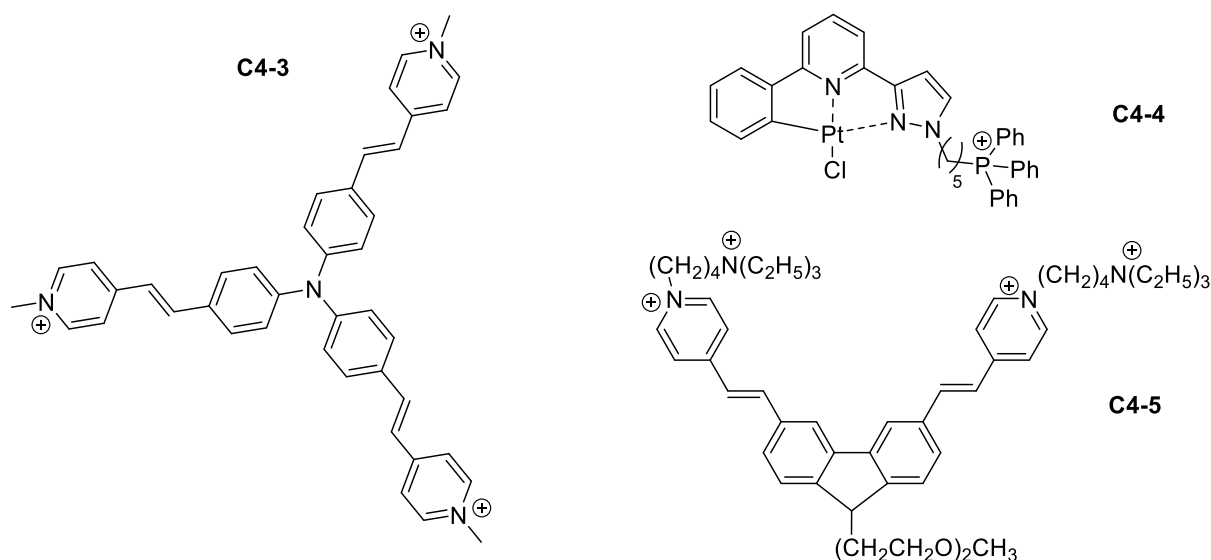


Figure 4- 3 : Exemple de chromophores absorbants à deux photons portant des groupes cationiques.

Les interactions avec l'ADN permettent la visualisation des noyaux en imagerie cellulaire. L'octupole **C4-3**[305] possède une section efficace de 700 GM et sa fluorescence est fortement exacerbée lors de l'interaction avec l'ADN. Ces propriétés ont permis de visualiser les noyaux de cellules et même de suivre une mitose grâce au marquage des chromosomes (Figure 4- 4). Des complexes de platine modifiés par un groupement cationique ont permis de visualiser les noyaux. L'imagerie cellulaire montre une sélectivité similaire à celle observée pour Hoechst 33342 mais qui est active à deux photons[306]. Les composés portant des charges cationiques sont aussi connus pour permettre le marquage des mitochondries et des lysosomes[308]. La molécule **C4-5** qui possède une section efficace calculée autour de 5000 GM est sélective des lysosomes comme le montre le co-marquage avec lyso-tracker.

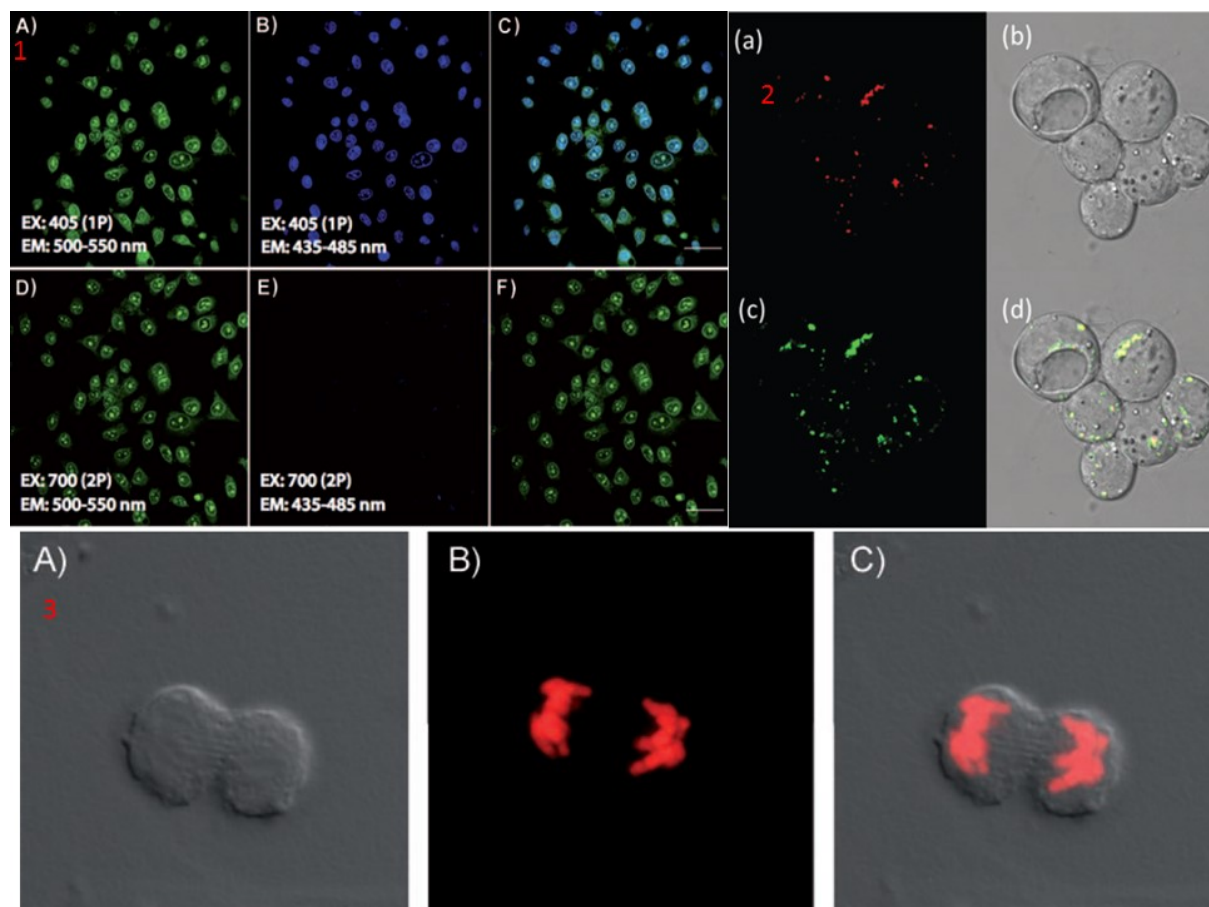


Figure 4- 4 : 1) a,d-fluorescence de C4-4 b,e- fluorescence de HOECHST c,f-superposition des fluorescences ; a,b,c-AUP ; d,e,f-ADP. 2) Imagerie confocale à un photon a-fluorescence de C4-5, b-image de contraste c-fluorescence de Lyso-tracker, d-superposition de a,b,c. 3) a-image de contraste, b-fluorescence de C4-3, c-Superposion de a,b.

I.3) Dérivé de sucre : membrane cellulaire, cellule cancéreuse

Les sucres, grâce aux liaisons hydrogènes formées par les fonctions alcools, permettent l'hydrosolubilisation des chromophores (Figure 4- 5). La molécule **C4-6** est un exemple de chromophore permettant de marquer la membrane cellulaire[303]. Des exemples de marquage de cellules cancéreuses sont aussi reportés comme pour le chromophore **C4-7** (ex=740, 1200 GM, em=510 nm, $\phi_f=0.10$ eau (Figure 4- 6)[309, 310].

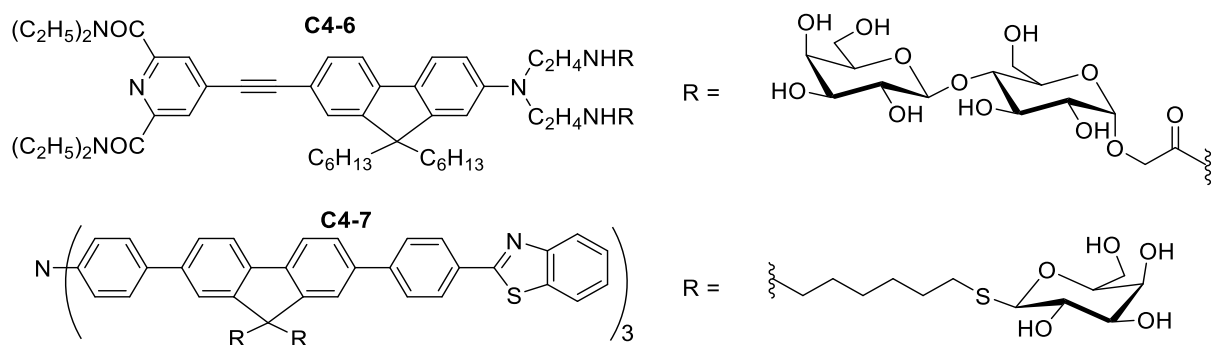


Figure 4- 5 : Chromophore substitué par des sucres.

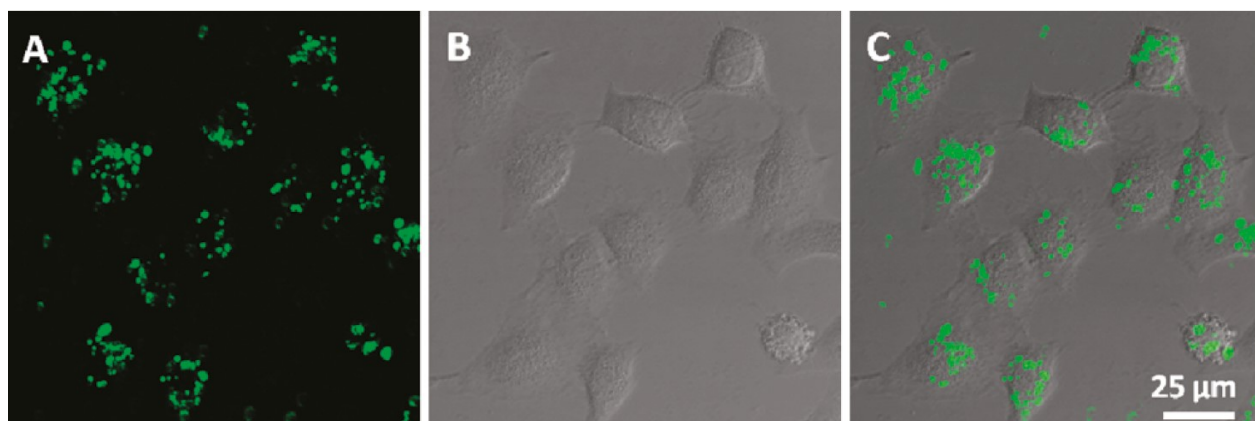


Figure 4- 6 : Marquage de cellule Hela par C4-7.

I.4) Vectorisation par effet de taille

Les méthodes présentées ont pour point commun d'être basées sur un effet de nombre de groupes solubilisants. La formation de dendrimères est une des méthodes qui permet de multiplier le nombre de groupements hydrosolubles permettant l'hydrosolubilisation du cœur organique[275].

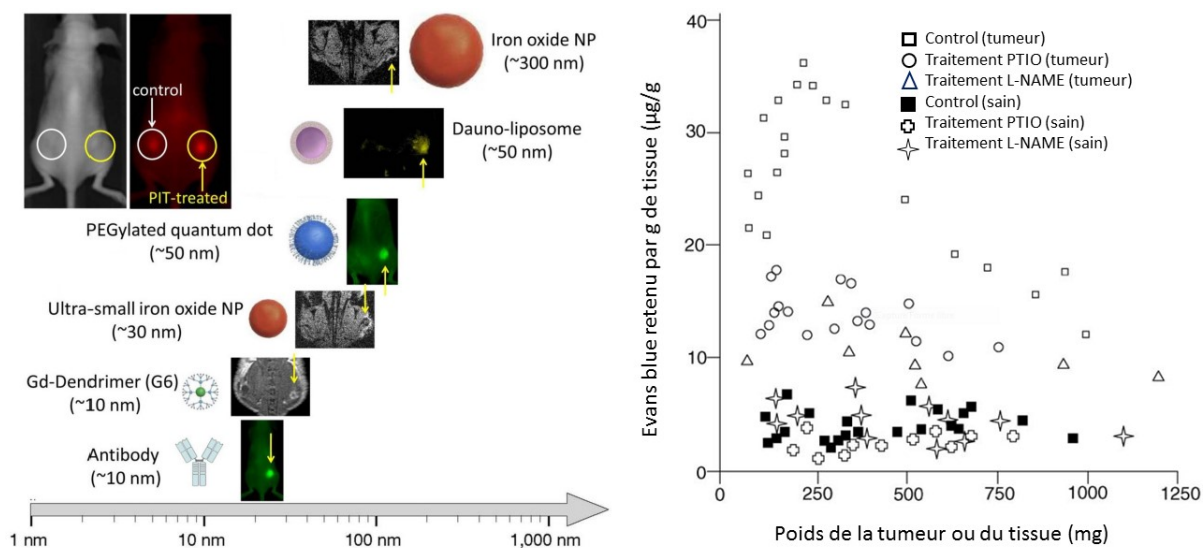


Figure 4- 7 : Exemple de dendrimère utilisé pour la visualisation de vaisseaux.

De la même façon, l'utilisation de polymère construit à partir de monomères hydrosolubles permet d'augmenter la taille de l'objet. On peut citer la formation de micelles par exemple à partir du pluronic. Cette technique a été évoquée au chapitre 3[275-277]. Le polymère peut être aussi construit autour du chromophore via un lien covalent, ce qui est le cas des chromophores cités au chapitre 3[311]. Une autre classe d'objet est les nanoparticules et les nanoparticules décorées par des polymères ou de chromophores encapsulés dans des nanoparticules de silice[312]. Ces objets sont généralement de grande taille et utilisés pour le ciblage de cellules cancéreuses selon le principe EPR (Figure 4- 7)[313, 314]. Ce principe stipule qu'à partir d'une certaine taille, les objets possèdent un temps de rétention dans l'organisme et une perméabilité sélectivement dirigée vers les tumeurs cancéreuses[108]. Il est aussi possible d'utiliser des nano-cargos pour transporter un principe actif[315-317]. Le chromophore peut aussi être directement greffé sur un polymère permettant d'augmenter la concentration en marqueur[222, 318].

I.5) Greffage de dérivés biologiques

L'utilisation de dérivés biologiques comme les acides-aminés, les peptides[319-321] et les anticorps[322] rend possible le ciblage de compartiments cellulaires ou de protéines (Figure 4- 8).

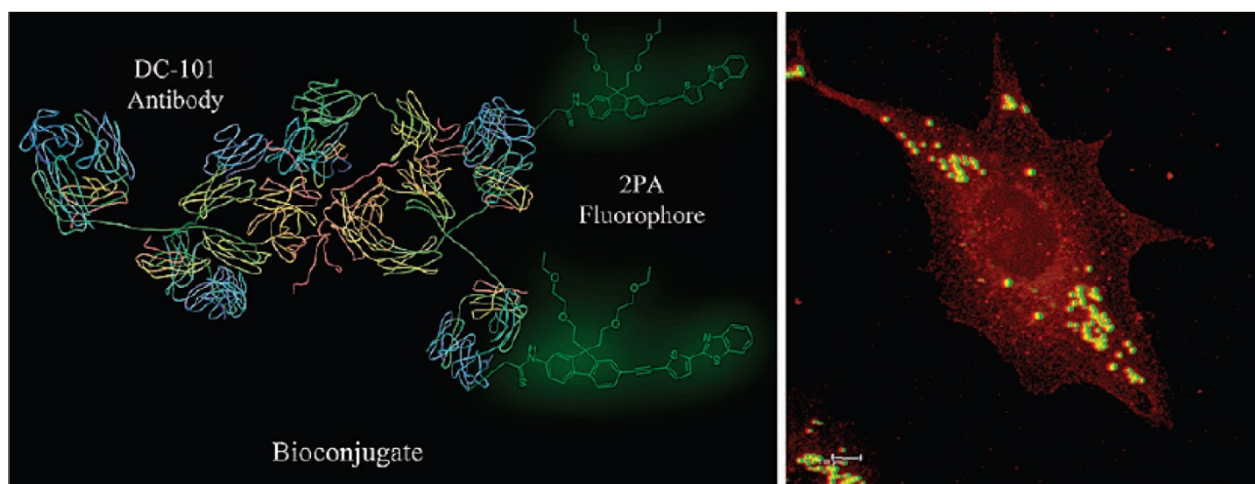


Figure 4- 8 : Exemple de chromophore absorbant à deux photons liés à l'anticorps DC-101 permettant d'imager la présence d'un récepteur de facteur de croissance de cellules endothéliales vasculaires.

Enfin, toutes les combinaisons de ces techniques permettent d'associer sélectivité et hydrosolubilité pour l'imagerie *in vivo* [323, 324].

Dans ce chapitre, la discussion se fera sur les polymères apportant l'hydrosolubilisation et sur les possibilités de modification structurales (charges, dérivés biologiques,...) permettant d'en améliorer les propriétés de ciblage, spécifiquement en direction du noyau des cellules cancéreuses.

II Polymères et vectorisations

Les polymères présentent l'avantage de présenter de nombreuses unités de répétitions permettant, sur un objet unique, de multiplier le nombre et éventuellement la nature des fonctions de ciblage évoquées dans la première partie de ce chapitre. Dans le cadre de nos études, nous nous sommes focalisés sur l'introduction de cations au sein des chaînes polymères.

II.1) Intérêt des polymères cationiques pour la vectorisation

Les polymères poly-cationiques sont connus pour permettre l'administration de médicaments dans des organismes vivants[325, 326]. Ils présentent différents avantages par rapport à leurs analogues neutres ou poly-anioniques. Le principal avantage est la contribution de charges positives à l'augmentation de la pénétration cellulaire. En effet, les cations favorisent les mécanismes d'endocytose via le renforcement des interactions avec les charges négatives de la couche phospholipidique de la membrane cellulaire[327]. Pour des raisons similaires, leur capacité à franchir d'autres barrières biologiques est accrue. Par exemple, il a été montré qu'un polymère naturel, le sulfate de protamine, permettait d'accroître la perméabilité à travers la barrière hémato-encéphalique[328]. Cette propriété peut être mise à profit pour délivrer des médicaments en thérapie du cancer du cerveau. Un autre avantage de ces objets est qu'ils peuvent présenter de fortes interactions avec des bio-polymères négativement chargés comme l'ADN. Cela permet de cibler les noyaux cellulaires et peut être utilisé dans le cadre de la thérapie génique.

La principale limite à leur utilisation en médecine est la toxicité connue d'un certain nombre de surfactants anioniques et cationiques. Cette dernière a été observée en milieu cellulaire et en milieu *in vivo*. Ainsi, le polyéthylèneimine commercial, lors de sa circulation vasculaire, provoque la coagulation sanguine[329]. Une autre cause de toxicité est l'augmentation de la mort cellulaire lors du traitement des cellules par des surfactants cationiques. La toxicité cellulaire est alors attribuée à la perméabilisation des membranes et à des mécanismes d'inhibition enzymatique[330]. Cette toxicité est un facteur limitant de l'utilisation de ces poly-cations. Cependant, des études récentes montrent que ces toxicités peuvent être réduites en jouant sur des paramètres structuraux. Le raccourcissement de la longueur des chaînes polymères prévient en effet la coagulation sanguine[329, 331]. De plus, l'utilisation de groupements cationiques hétéro-aromatiques (pyridinium/ imidazolium) est préférable, par rapport à des ammoniums quaternaires alkyles[332].

II.2) Objectif du projet

Le but de cette présente étude est d'apporter des modifications ciblées sur les systèmes polymères analogues à ceux introduits au chapitre 3, afin de permettre un ciblage cellulaire, notamment de cellules/tissus cancéreux. De par la méthode de polymérisation ATRP utilisée, deux types de modifications sur les chaînes polymères peuvent être envisagées (Figure 4- 9).

La première consiste à modifier la position terminale. En effet, la polymérisation par ATRP implique le transfert de l'atome de brome présent sur l'initiateur de polymérisation, qui se retrouve en position terminale de l'édifice après polymérisation, permettant d'envisager des fonctionnalisations ultérieures mettant en jeu cette position. Ces fonctionnalisations peuvent intervenir par différentes réactions de substitution nucléophile, permettant l'introduction de fonctions de ciblage évoquées dans l'introduction.

La seconde approche, qui a été celle développée dans le cadre de cette thèse, consiste à apporter une modification sur les chaînes latérales du polymère. Notre groupe a en effet développé une stratégie permettant une substitution quantitative des groupes hydroxyles des chaînes oligomères sur des polymères du 2-hydroxyethyl acrylate par des atomes de brome, et d'utiliser cette plateforme pour l'introduction de fonctions cationiques par quaternarisation de nucléophiles azotés ou phosphorés [283]. Dans le cadre des applications biologiques, cette méthode permettra de transformer notre sonde polymère neutre en sonde polycationique et d'espérer une internalisation spécifique au sein des cellules, plus spécifiquement au niveau des régions riches en ADN, noyau et mitochondries.

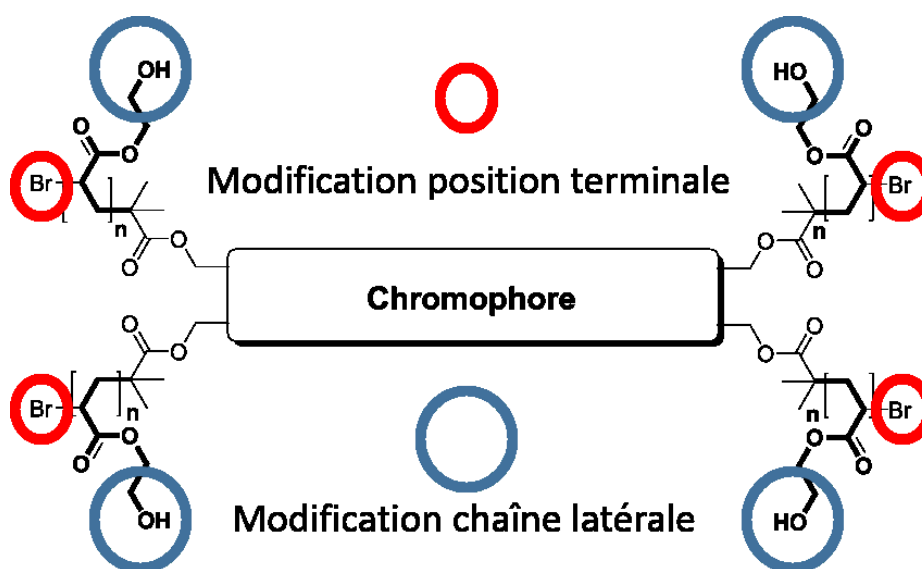


Figure 4- 9 : Position modifiable des chaînes polymères.

II.2.a) Groupements envisagés pour le greffage

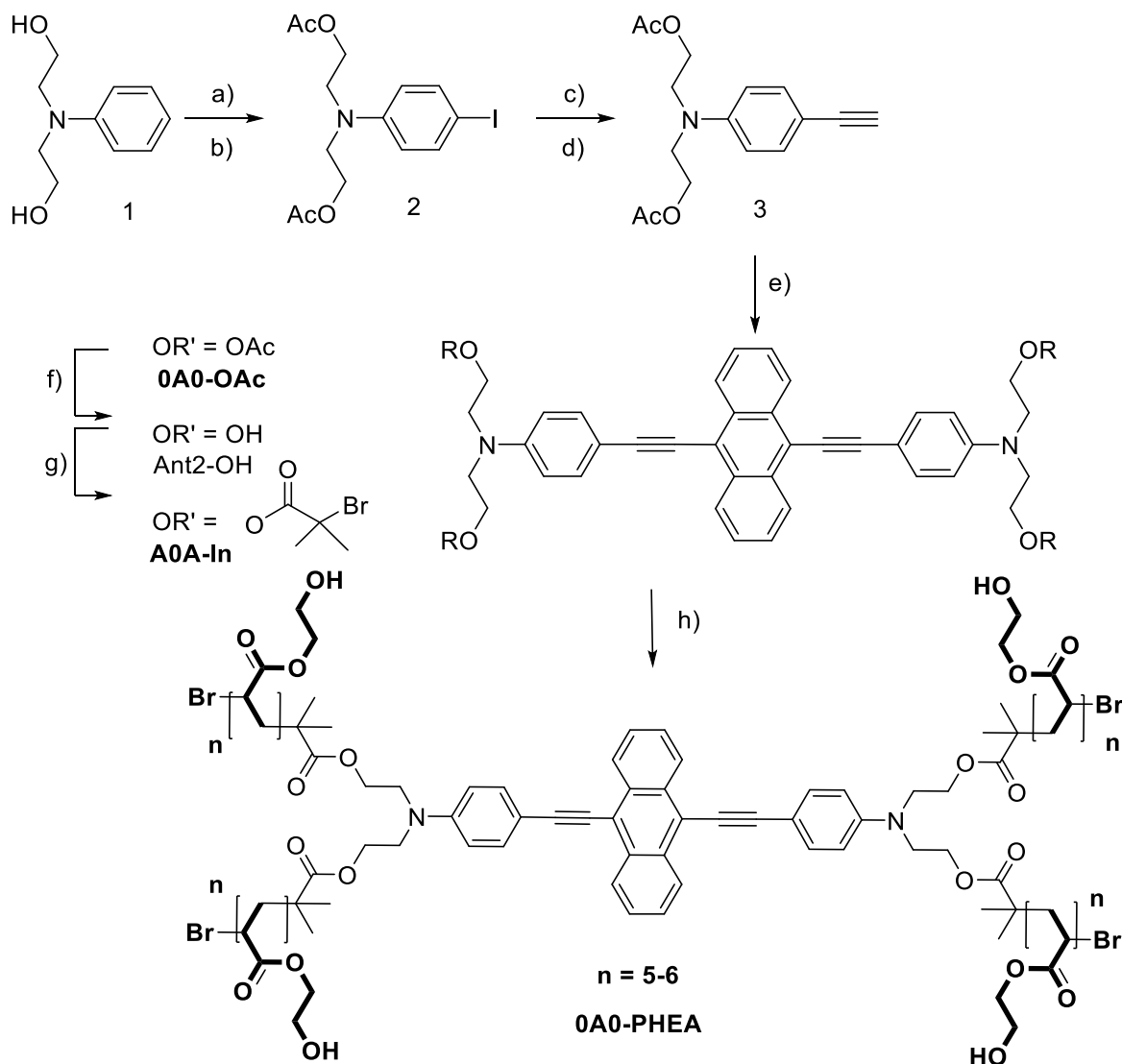
Deux nucléophiles différents ont été envisagés :

- les groupements ammoniums quaternaires (méthyl(imidazolium), par exemple) obtenus après substitution nucléophile du méthyl(imidazole) sur les bromes. Les charges positives doivent permettre une pénétration renforcée à travers les différentes barrières biologiques, et nous espérons par ailleurs que des interactions avec l'ADN permettront d'envisager une accumulation spécifique au sein du noyau des cellules.
- les phosphoniums obtenus à partir de trialkylphosphines. Ces cations ont été principalement utilisés pour promouvoir une accumulation spécifique au sein des mitochondries, autre compartiment de grande importance dans le métabolisme cellulaire.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes focalisés sur l'introduction de méthylimidazolium sur les chaînes polymères

II.2.b) Choix du chromophore modèle

Afin d'étudier les phénomènes d'internalisation cellulaire de ces structures, nous avons choisi d'y intégrer un fluorophore **0A0**, possédant des propriétés spectroscopiques les plus optimisées pour le suivi en imagerie cellulaire confocale ($\phi_F = 0,62$, $\varepsilon = 42000\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Nous avons par ailleurs montré que ce chromophore était aussi actif à deux photons et possédait une remarquable figure de mérite ($f = 240 \text{ GM}$) [224]. Ce chromophore avait déjà été synthétisé au laboratoire avec des chaînes polymères de type PHEA. Une modification de la synthèse a été mise au point afin de faciliter l'obtention de produit pur et la longueur de la chaîne polymère utilisée est réduite de moitié pour ne pas introduire un trop grand nombre de groupements chargés et de minimiser les risques de toxicité du système (Figure 4- 10). Les longueurs de chaînes calculées ont pour valeur de $n = 5-6$.



a) I₂, THF/Pyridine, RT ; b) Ac₂O, Pyridine, RT ; c) Trimethylsilylacetylene, THF/Et₃N, PdCl₂(PPh₃)₂/CuI, RT ; d) TBAF, Et₂O, RT ; e) 1,8-dibromoanthracene, Toluene/Et₃N, PdCl₂(PPh₃)₂/CuI, 80°C f) K₂CO₃, THF/MeOH, RT ; g) 2-bromo-isobutyryl bromide, THF/Pyridine, RT; h) CuBr/2,2'-bipyridine, hydroxyethylacrylate/THF, 85°C

Figure 4- 10 : Synthèse du chromophore 0A0-PHEA.

II.3) Modification de la chaîne polymère.

L'introduction des fonctions cationiques le long des chaînes polymère a tout d'abord été envisagée selon la méthodologie développée au laboratoire. Une première étape consiste dans la bromation des fonctions alcools latérales, en utilisant du TMSBr dans le dichlorométhane à 0°C. Le polymère bromé est ensuite engagé dans une réaction de substitution nucléophile avec le N-méthylimidazole à 85°C. Le N-méthylimidazole joue à la fois le rôle de solvant et de réactif (Figure 4- 11)[283].

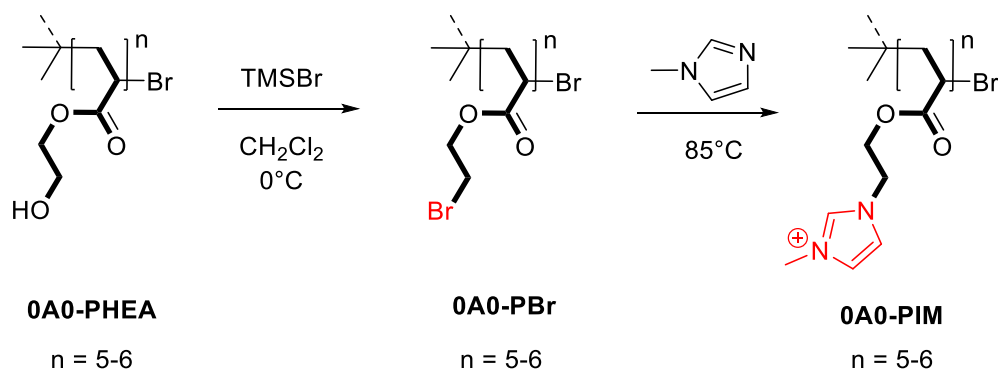


Figure 4- 11 : Modification des chaînes latérales de 0A0-PHEA.

0A0-PBr est caractérisé en IR (Figure 4- 12) et RMN (Figure 4- 13). La solubilité du composé obtenu dans le dichlorométhane indique la substitution de la majorité des fonctions alcools confirmée par le spectre IR qui montre la disparition de la bande de vibration correspondant à l'élongation de la liaison O-H. En RMN, de nouveaux signaux dans la zone des protons aromatiques semblent montrer que le cœur anthracène a été partiellement dégradé au cours de la réaction, ce qui semble confirmé par le changement de couleur du produit, initialement orangé, en solution, et désormais jaune.

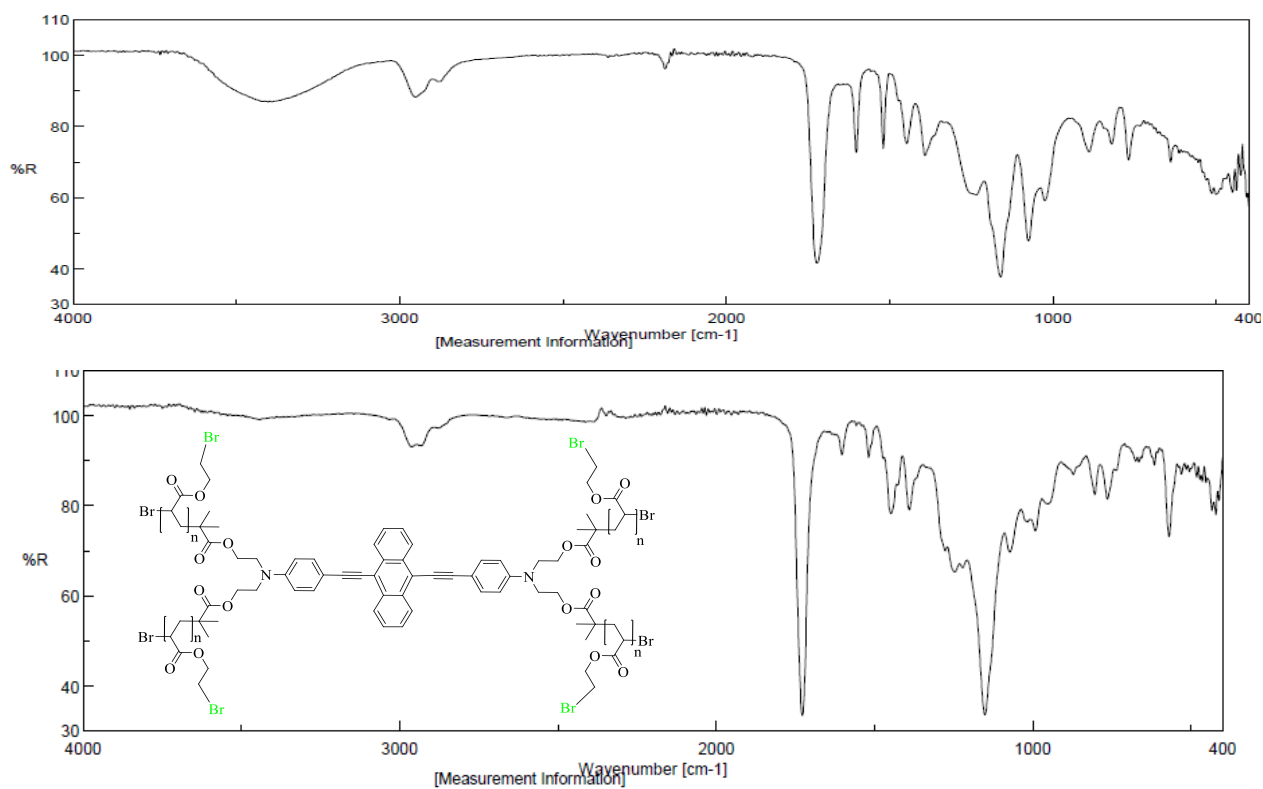


Figure 4- 12 : Spectre IR de 0A0-PHEA(haut) et 0A0-PBr (bas).

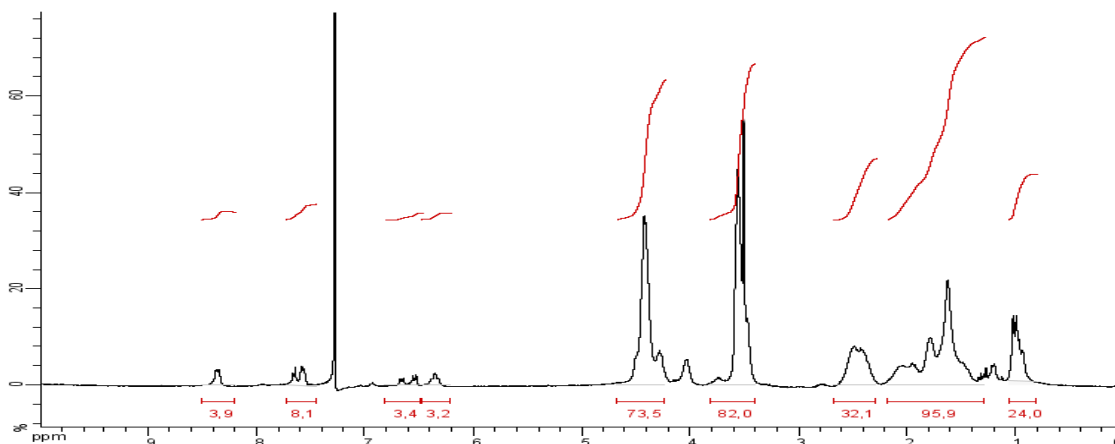


Figure 4- 13 : Spectre RMN de OA-PIM dans $CDCl_3$.

Malgré cette dégradation au moins partielle, la réaction avec l'imidazole a tout de même été menée. A la suite de cette réaction, on retrouve la fluorescence orangée initiale, ce qui tend à indiquer que le cœur anthracène n'a pas été entièrement dégradé au cours de l'étape précédente. La RMN montre cependant toujours la présence de pics additionnels dans les aromatiques et indique qu'environ 75% des fonctions alcools ont été substituées par des groupements imidazoliums.

Ce chromophore à cause des impuretés ne peut pas être étudié en biologie. Des études préliminaires en imagerie ont cependant montré son potentiel et ont poussé à développer une nouvelle stratégie de synthèse. Ces résultats insatisfaisants nous ont poussés à envisager une nouvelle voie de synthèse pour ces objets.

II.4) Nouvelle stratégie de synthèse

Elle consiste à introduire un groupement sulfonyle pour permettre ensuite la substitution par le méthyl-imidazole (Figure 4- 14).

Les premiers essais ont été réalisés avec du chlorure de tosyle. Lors de cette réaction, seulement 75% des fonctions hydroxy ont été transformées, ce que nous avons attribué au fort encombrement de la chaîne polymère induit par la présence de ces groupements. De fait, l'utilisation du chlorure de mésyle a permis d'obtenir une conversion de 100% d'après le spectre RMN (Figure 4- 15). Le groupement méthyle-imidazole a alors été introduit en utilisant les conditions usuelles. On obtient un polymère avec plus de 90% de fonctions sous forme imidazolium. La RMN 1H montre l'absence de signaux inconnus dans la zone des aromatiques, signifiant l'absence des sous-produits obtenus lors de la réaction avec le TMSBr (Figure 4- 16).

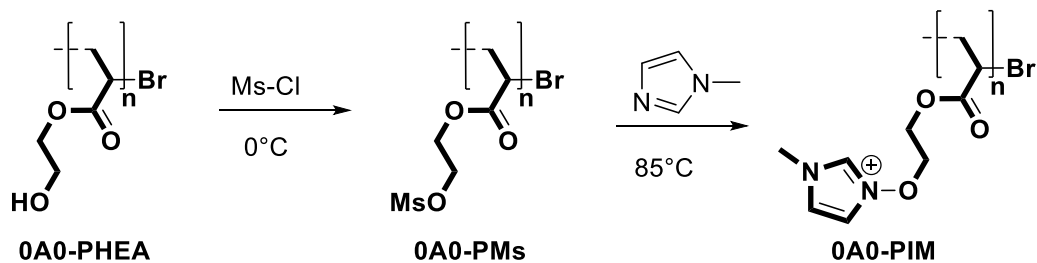


Figure 4- 14 : Obtention de 0A0-PIM.

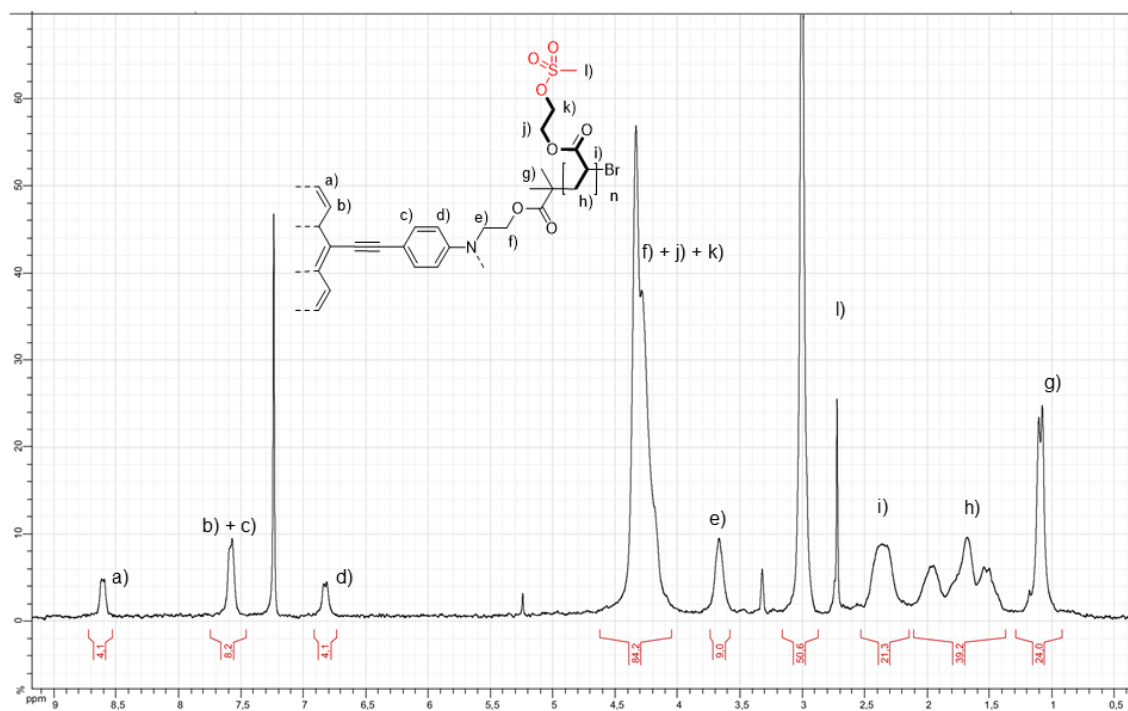


Figure 4- 15 : Spectre RMN de 0A0-PMs.

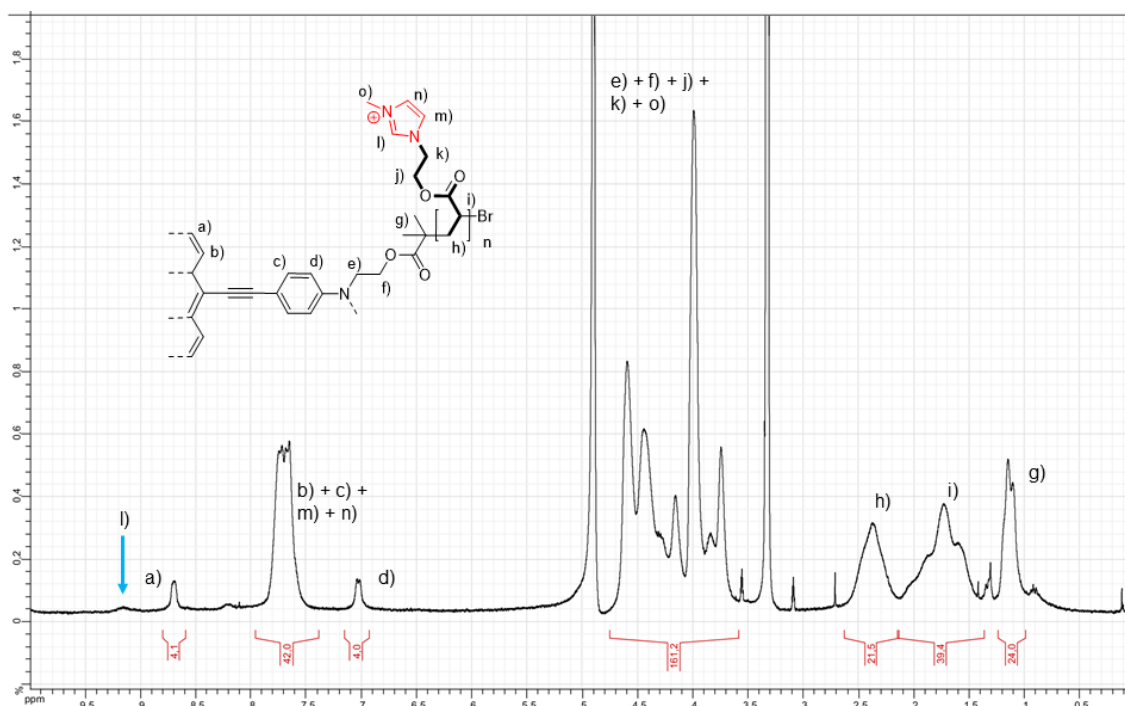


Figure 4- 16 : Spectre RMN de 0A0-PIM.

Pour rendre compte de la différence de comportement entre les chromophores **0A0-PHEA** et **0A0-PIM**, des études de complexation avec l'ADN ont été réalisées.

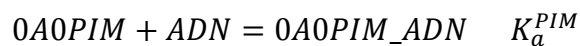
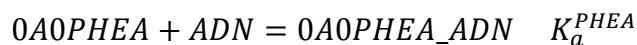
III Etude de la complexation de l'ADN par 0A0-PHEA et 0A0-PIM

III.1) Introduction aux études de complexation

Ces études ont été réalisées en Pologne par le groupe de Marek Samoc. Le but était d'étudier l'effet de la présence de chaînes polymères sur les propriétés d'association de la sonde, et plus spécifiquement de comparer les constantes d'association obtenues dans le cas d'une substitution par des chaînes poly-imidazolium par rapport à la chaîne poly-hydroxy[333]. Il semble en effet raisonnable d'espérer que la présence des chaînes poly(cationiques) renforce les interactions entre la sonde et les groupements phosphates périphériques de l'ADN.

Nous avons donc comparé le processus d'association de l'ADN avec **0A0-PHEA** et **0A0-PIM**. L'étude d'association d'un chromophore avec l'ADN consiste à déterminer la constante

d'association de la formation du complexe chromophore_ADN dont les équations sont les suivantes :



Outre la détermination de la constante d'association, il est intéressant de savoir dans quelles parties de l'ADN la complexation a lieu, et comment elle affecte la structure de ce dernier. L'interaction de l'ADN avec les chromophores intervient classiquement au travers de trois processus principaux, associés à trois zones distinctes. Il peut y avoir intercalation entre les nucléotides au sein de l'hélice de l'ADN comme dans le cas de l'ethidium bromide. Les interactions peuvent aussi avoir lieu à la périphérie de l'ADN, soit dans le grand pas de l'hélice nommé sillon majeur, soit dans le petit pas de l'hélice dit sillon mineur (Figure 4- 17).

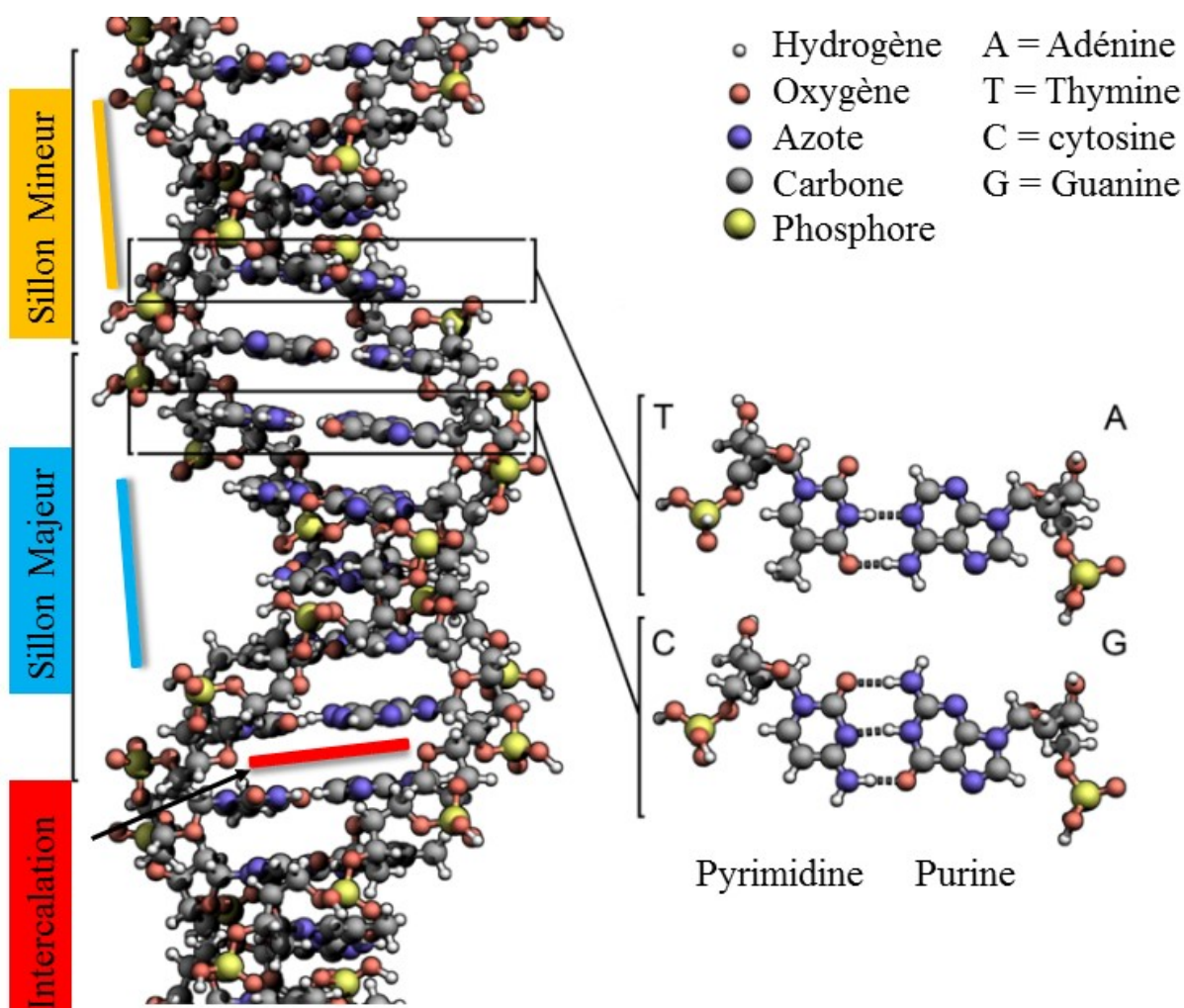


Figure 4- 17 : Représentation de l'ADN et des différentes zones d'interactions possibles.

III.2) Détermination de la constante d'association

La complexation du chromophore au sein de l'ADN induisant un changement de son spectre d'absorption, leur constante d'association a été déterminée par un suivi de la variation de l'absorbance en fonction d'ajouts d'ADN au maximum de la bande d'absorption ICT d'une solution de chromophore. La constante d'association (K_a^{0A0}) a été calculée à trois températures différentes (Tableau 4- 1) en utilisant l'équation suivante[334, 335] :

$$\frac{1}{A - A_0} = \frac{1}{A_\infty - A_0} + \frac{1}{K_a(A_\infty - A_0)} \times \frac{1}{[ADN]}$$

avec :

- A_0 et A : Respectivement l'absorbance initiale de la solution de chromophore avant ajout d'ADN, et l'absorbance de la solution,
- A_∞ : absorbance de l'espèce chromophore entièrement complexée à l'ADN,
- K_a : la constante d'association,
- $[ADN]$: la concentration d'ADN.

Température (°K)	298	304	310
K_a^{PHEA} (L.mol ⁻¹)	$2.52 \cdot 10^5$	$3.68 \cdot 10^5$	$5.18 \cdot 10^5$
K_a^{PIM} (L.mol ⁻¹)	6.98×10^4	8.38×10^4	9.80×10^4

Tableau 4- 1 : Constante d'association des adduits **0A0-PHEA**_ADN et **0A0-PIM**_ADN.

Les deux sondes polymères montrent une constante d'association à l'ADN relativement élevée, comparable en magnitude avec celle décrite pour des sondes ADN commerciales. De manière surprenante, on peut remarquer que les constantes d'association mesurées apparaissent légèrement supérieures pour **0A0-PHEA** que pour **0A0-PIM**. La présence de groupements cationiques ne semble donc pas favoriser l'interaction avec l'ADN.

L'étude des effets de la complexation sur le spectre d'absorption permet d'obtenir des informations sur le mode d'association[336]. Une intercalation dans l'ADN provoque généralement un déplacement hypsochrome de la longueur d'onde d'absorption. En cas d'interaction dans les sillons de l'ADN, peu d'évolutions de la position de la bande sont observées. C'est cette dernière hypothèse qui est vérifiée dans le cas de **0A0-PHEA** et **0A0-PIM**, ce qui semble exclure l'intercalation comme phénomène prédominant (Figure 4- 18).

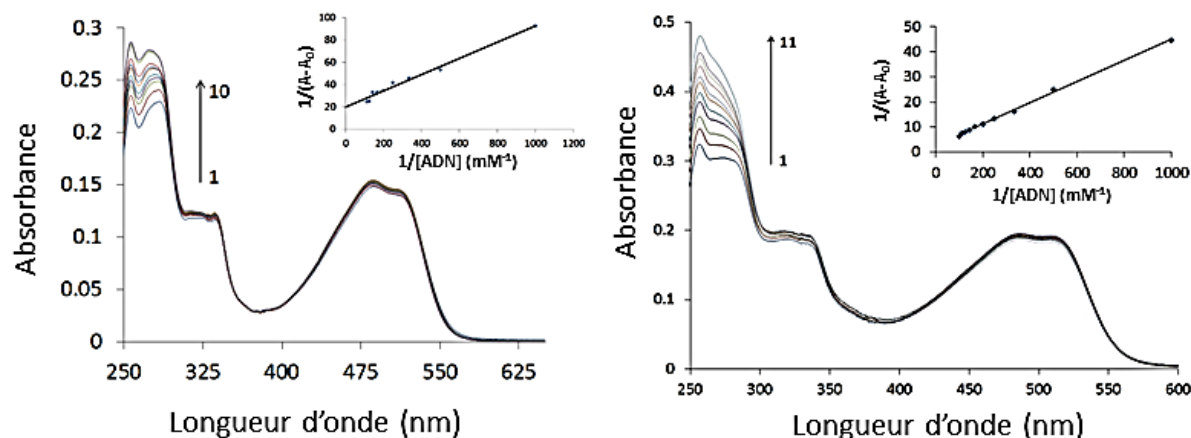


Figure 4- 18 : Spectre UV-Vis du chromophore (5 μM) traité par : 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 7.0, 8.0, 9.0, et 10.0 μM d'ADN à 298 °K dans le cacodylate de sodium trihydraté 10 mM (pH 7.25). Insert: Tracé de $1/(A-A_0)=f(1/[DNA])$ à 298 °K. gauche : 0A0-PHEA, droite 0A0-PIM.

III.3) Evolution de la fluorescence lors de l'association

De manière assez inattendue, les évolutions observées au niveau de la fluorescence sont très différentes selon le chromophore. L'association de **0A0-PHEA** avec l'ADN s'accompagne d'une augmentation du signal de fluorescence de 20% environ, alors que l'évolution est inversée pour **0A0-PIM** qui voit sa fluorescence diminuer dans des proportions comparables lors de l'ajout d'ADN. Ces observations suggèrent un mode d'association sensiblement différent des deux molécules avec l'ADN.

III.3.a) Etude de 0A0-PHEA

L'augmentation de l'intensité de fluorescence est classiquement le fruit, soit d'un transfert d'énergie de l'ADN vers le chromophore **0A0-PHEA** complexé, soit de la diminution de la polarité de l'environnement autour de **0A0-PHEA** compatible avec des interactions avec les bases hydrophobes de l'ADN[337]. L'augmentation du rendement quantique peut aussi être expliquée par la complexation de l'ADN qui diminue les rotations du squelette carboné du chromophore, ce qui limite les phénomènes de désexcitation non-radiative vibrationnelle contenus dans le terme k_{nr} . La titration de l'ADN par le chromophore permet de déterminer la coordination du chromophore avec 5 paires de bases. Cette valeur est cohérente avec une interaction dans le sillon mineur (Figure 4- 19).

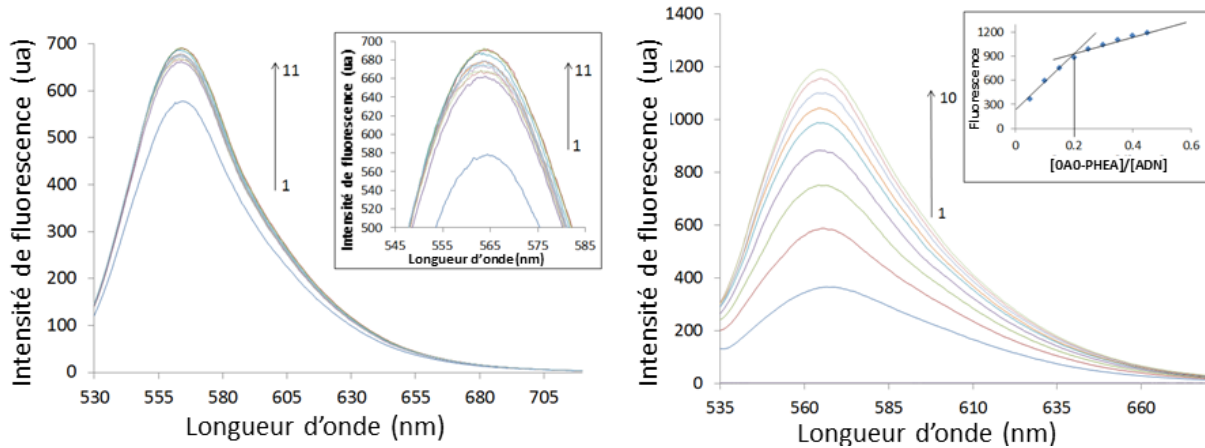


Figure 4- 19 : Gauche : Spectre d'émission de 0A0-PHEA (5.0 μM) traité par : 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, et 10.0 μM d'ADN à température ambiante. Droite : Spectre d'émission de fluorescence de l'ADN (50 μM) traité par 0.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0, 17.5, 20.0 et 22.5 μM de 0A0-PHEA.

III.3.b) Etude de 0A0-PIM

La diminution de la fluorescence lors de la formation de l'adduit **ADN_0A0-PIM** est généralement attribuée à des transferts d'énergie du chromophore vers les bases nucléotidiques de l'ADN. Cette évolution peut être étudiée en utilisant l'équation de Stern-Volmer [1]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q]$$

Avec :

- F_0 et F intensité de fluorescence en présence et absence d'AND,
- K_{sv} constante de Stern-Volmer,
- $[Q]$ concentration en ADN,
- τ_0 temps de vie de l'état excité de la biomolécule égale à 10^{-8} s,
- K_q constante d'inhibition apparente.

Pour des inhibitions dynamiques par interaction avec les biopolymères, les constantes K_q sont de l'ordre de $2.0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Dans notre étude nous mesurons des constantes K_{sv} et K_q respectivement de $2.58 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ et $2.58 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. La valeur de K_q supérieure à $2.0 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ signifie qu'il y a formation d'un complexe **ADN-0A0_PIM** et que l'inhibition est statique. En réalisant une titration de fluorescence, on peut déterminer la constante d'association (K_f) de **0A0-Pim_DNA** et le nombre de paires de bases (n) impliquées dans la complexation via l'utilisation de l'équation :

$$\log \frac{(F_0 - F)}{F} = \log K_f + n \log [Q]$$

Le tracé de $\log[(F_0-F)/F]$ versus $\log[Q]$ donne une droite. L'étude de la pente de cette droite et de son ordonnée à l'origine permet de déterminer les valeurs de K_F et n qui sont respectivement de $31.80 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ et de 1.26 (Figure 4- 20) La constante d'association déterminée est ici du même ordre de grandeur et même légèrement plus forte que celle déterminé pour **0A0-PHEA** mais la méthodologie différente utilisée pour la mesure empêche de tirer des conclusions définitives sur ce dernier point.

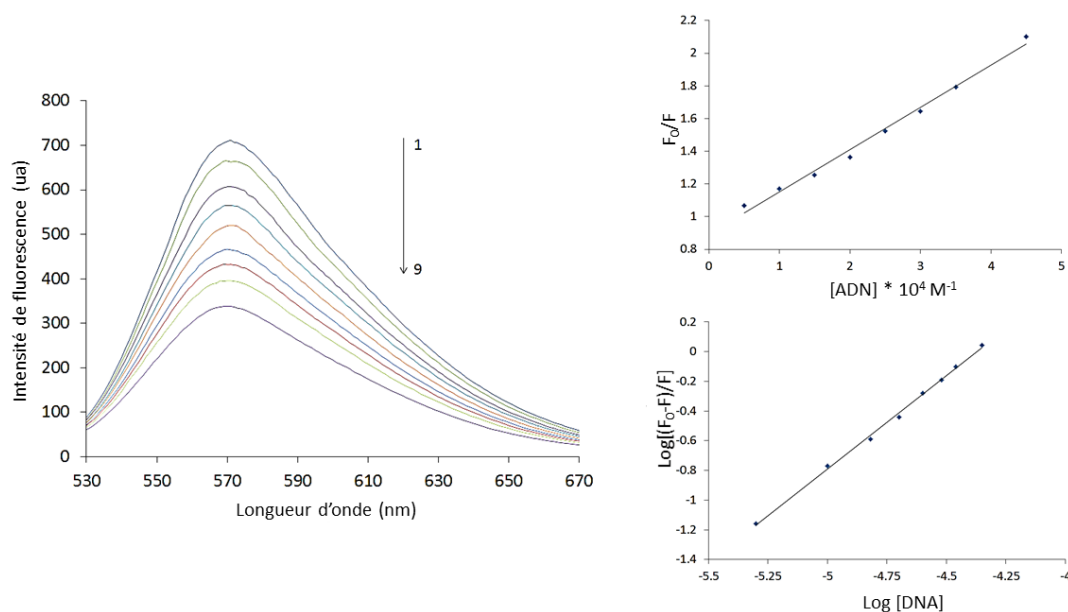


Figure 4- 20 : Inhibition de 0A0-PIM par l'ADN.

Des études de compétition avec le bromure d'éthidium (intercalant) et Hoechst 33258 (marqueur du sillon majeur) ont été réalisées [338](annexe). S'il y a compétition avec l'un des chromophores, on doit observer une diminution de l'intensité de fluorescence due à la formation du complexe **0A0-PIM_ADN**, et on doit également observer des variations importantes de la luminescence des marqueurs déplacés. S'il n'y a pas de compétition, alors l'intensité de fluorescence générée par **0A0-PIM** doit rester constante. Dans le cas du bromure d'éthidium, aucune variation de fluorescence induite par EB n'est observée. Ce résultat confirme que **0A0-PIM** ne s'intercale pas dans l'ADN. Lors de la compétition avec Hoechst, on observe une décroissance de l'intensité de fluorescence issue de Hoechst, ce qui signifie qu'il y a compétition. Cela confirme le mode d'association dans les sillons de l'ADN.

III.4) Etude thermodynamique

III.4.a) Equation de Van't Hoff

Différents types de forces peuvent être impliquées dans la formation de l'adduit chromophore-ADN. On peut citer les liaisons hydrogènes, les forces de Van der Waals, notamment les interactions électrostatiques et les interactions hydrophobes. Les valeurs de l'entropie et de l'enthalpie peuvent permettre de remonter à la nature de l'interaction dominante. Ces paramètres sont calculés à partir de mesures de constante d'association à différentes températures, en utilisant l'équation de Van't Hoff :

$$\log Ka = -\frac{\Delta H^0}{2.303RT} + \frac{\Delta S^0}{2.303R} = -\frac{\Delta G^0}{2.303RT}$$

Chromophore	Température (°K)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG (kJ mol ⁻¹)
0A0-PHEA	298 K			-30.81
	304 K	45.70	256.76	-32.35
	310 K			-33.90
0A0-PIM	298 K			-27.63
	304 K	22.12	166.91	-28.65
	310 K			-29.62

Tableau 4- 2 : Données thermodynamiques calculées pour 0A0-PHEA et 0A0-PIM.

ΔG^0 est négatif, ce qui signifie que le processus est thermodynamiquement favorisé. ΔH^0 et ΔS^0 sont toutes deux positives, indiquant un processus d'association favorisé par l'entropie. La complexation dans les systèmes macromoléculaires est généralement due à l'effet entropique à cause du nombre de molécules de solvant (eau) déplacées lors de l'association. Bien que ce type de profil d'association (enthalpiquement défavorable et entropiquement favorable) soit généralement attribué à des processus d'associations stabilisés par liaison hydrophobe, on ne peut pas exclure cependant l'importance des liaisons hydrogènes pour **0A0-PHEA** et d'interactions électrostatiques entre **0A0-PIM** et les groupes phosphate de l'ADN.

III.4.b) Effet de la force ionique

L'ajout de NaCl conduit à des évolutions différentes en fonction du chromophore étudié. L'effet de la force ionique est faible pour **0A0-PHEA**, ce qui est en accord avec la présence d'interactions faibles avec les groupes phosphates (liaisons hydrogènes). Ce n'est pas le cas pour **0A0-PIM**, ce

qui est cohérent avec la nature électrostatique des interactions avec les mêmes groupes phosphates. Des titrages d'une solution de chromophore par addition progressive d'ADN, en présence de différentes concentrations en chlorure de sodium, sont réalisés et la constante d'association est calculée, sur la base des variations du spectre d'absorption. La constante d'association mesurée dans les différentes conditions de force ionique permet de remonter à la contribution électrostatique et non-électrostatique des différentes espèces (Tableau 4- 3). En supposant que Ψ est égale à 0,88 (nombre d'ions sodium par groupe phosphate qui sont relargués lors de l'association) et Z le nombre de groupes phosphate qui interagissent avec le chromophore anthracène. Le produit $Z \Psi$ est déterminé à partir de l'équation :

$$-Z\Psi = \frac{\delta \log K_a}{\delta \log [Na^+]}$$

Le tracé de $\log K_a$ *versus* $\log [Na^+]$ donne une droite ce qui permet de trouver une valeur de 1.13 pour le produit $Z \Psi$. On peut alors déterminer $Z=1,25$, nombre de contacts électrostatiques entre les phosphates et **0A0-PIM**. Cette valeur est cohérente avec les valeurs d'autres molécules polycationiques en association avec du *ds*-DNA. La contribution électrostatique de l'énergie de Gibbs (ΔG_{el}) et sa contribution non-électrostatique sont calculées à partir de l'énergie de Gibbs et de l'équation suivante :

$$\Delta G_{el} = Z\Psi RT \ln([Na^+])$$

$$\Delta G_{nel} = \Delta G_t - \Delta G_{el}$$

[Na ⁺] (M)	K _a × 10 ⁴ (M ⁻¹)	ΔG (kJ mol ⁻¹) à 298 °K avec [Na ⁺] = 0.01 M		
		ΔG _t	ΔG _{nel}	ΔG _{el}
0.005	6.98	-27.62	-14.83	-12.79
0.010	1.68	—	—	—
0.020	1.32	—	—	—
0.050	0.43	—	—	—

Tableau 4- 3 : contribution électrostatique dans l'association de **0A0-PIM** avec l'ADN.

Il apparaît que les forces électrostatiques jouent un rôle prédominant dans la stabilisation de l'adduit **0A0-PIM_DNA** et la contribution est toute aussi importante que celle des interactions hydrophobes. Thermodynamiquement, les effets de la force ionique sont liés à l'entropie dont les

variations sont attribuées au mélange de contre-ions relargué par l'ADN lors de l'interaction avec **0A0-PIM**. Ces variations dépendent de la nature des ions en solution et de leur concentration.

III.5) Influence de la complexation sur la structure de l'ADN : étude de dichroïsme circulaire

Pour évaluer l'impact des chromophores sur l'ADN, des mesures de CD ont été effectuées (Figure 4- 21). L'ADN libre est caractérisé par un signal de CD positif dans la zone 260-280 nm dû à l'interaction avec les bases et une bande négative autour de 245 nm due à l'hélice hélicoïdale droite de l'ADN (les positions dépendant de la séquence d'ADN). Les chromophores sont achiraux, donc optiquement inactifs. Cependant, leur interaction avec l'ADN va modifier les bandes CD (ICD) à cause du couplage entre le moment électrique de transition du chromophore et des bases de l'ADN. Pour **0A0-PHEA**, l'addition du chromophore se traduit par des variations faibles du spectre CD, avec une diminution de l'intensité des deux bandes, ce qui semble confirmer que l'association des deux espèces induit peu de changements dans la conformation de l'ADN. A l'inverse, dans le cas de **0A0-PIM**, des changements plus marqués sont observés. Une augmentation d'environ 2 mdeg associée à un déplacement bathochrome du spectre suggère une perturbation plus forte de la structure de l'ADN. L'apparition d'un point isoelliptique suggère la formation d'une espèce complexée unique.

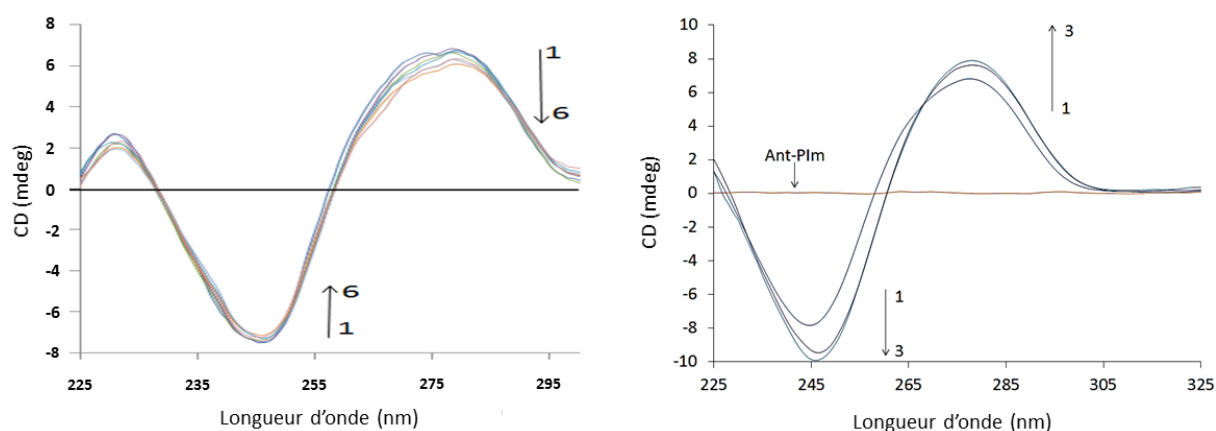


Figure 4- 21 : gauche) Spectre de Dichroïsme circulaire de l'ADN (50.0 µM) traité par: 0.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, et 30.0 µM (1-6) de 0A0-PHEA. droite) Spectre de Dichroïsme circulaire(CD) de l'ADN (50.0 µM) traité par: 0.0, 10.0 et 20.0 µM (1-3) de 0A0-PIM.

III.6) Bilan

L'étude des deux versions du chromophore anthracène montre qu'elles possèdent des efficacités assez proches de complexation de l'ADN : les valeurs des constantes d'association ($10^{-5} \text{ L.mol}^{-1}$) et les sites de complexations sont globalement identiques (sillon mineur et bases A et T). Cependant, la nature des interactions semble sensiblement différente. Pour **0A0-PHEA** les interactions hydrophobes du cœur anthracène sont majoritaires et la présence de liaisons hydrogène n'influe que légèrement sur la force de l'association, à l'inverse pour **0A0-PIM** les interactions hydrophobes et électrostatiques ont une contribution d'un ordre de grandeur comparable à l'association. Des études intracellulaires ont été réalisées afin de comparer l'influence des chaînes polymères sur la pénétration cellulaire et le ciblage de ce dernier.

IV Etude in cellulo des chromophores

Afin de mettre en évidence d'éventuelles différences de comportement des sondes **0A0-PHEA** et **0A0-PIM** sur les cellules, une étude de spectroscopie confocale a été réalisée au sein de deux lignées cellulaires tumorales classiquement utilisées en laboratoire, les cellules F98 et CHO-K1.

IV.1) Principe de l'étude

Pour confirmer la localisation des sondes dans les différents compartiments cellulaires, différents marqueurs spécifiques de ces compartiments ont été utilisés. La molécule DRAQ5 a été utilisée pour le marquage des noyaux et la molécule Lyso tracker red pour celui des lysosomes. Ces marqueurs ont été sélectionnés parce que leurs absorptions ne recouvrent pas celle du dérivé anthracène. Trois expériences sont réalisées en parallèle selon que le marqueur est ajouté ou non en même temps que le dérivé anthracène. Pour chaque dérivé anthracène trois échantillons sont préparés :

- un premier avec seul le dérivé anthracène,
- un second avec le dérivé anthracène et le marqueur DRAQ5,
- un troisième avec le dérivé anthracène et le marqueur Lyso tracker red.

Trois « blancs » ont par ailleurs été réalisés : un premier sans marqueur, afin de vérifier la viabilité des cellules ; un autre avec le marqueur DRAQ5 seul ; un dernier avec uniquement le marqueur

Lyso tracker red. Seuls les résultats des images de co-marquage sont rapportés pour **0A0-OAc** (Figure 4- 22), pour **0A0-PHEA** (Figure 4- 23) et pour **0A0-PIM** (Figure 4- 24) dans les cellules F98 et pour **0A0-PHEA** (Figure 4- 25) et pour **0A0-PIM** (Figure 4- 26) dans les cellules CHO-K1.

IV.2) Microscopie confocale

IV.2.a) Cellules F98

Les résultats indiquent que pour les cellules F98, le noyau n'est pas marqué, ce quel que soit le dérivé anthracène considéré. Des différences apparaissent néanmoins dans le marquage du cytoplasme. **0A0-OAc** semble se répartir relativement uniformément au sein du cytoplasme. Les lysosomes sont marqués, mais ce marquage ne semble pas spécifique.

A l'inverse, dans le cas de **0A0-PHEA** et de **0A0-PIM**, les lysosomes sont marqués spécifiquement. Le marquage de **0A0-PHEA** est plus diffus que celui **0A0-PIM**. Le marquage de **0A0-PIM** cible les mêmes zones que Lyso tracker red. Toutefois, une forte mortalité cellulaire (~30% à t=0) est observée dans les échantillons marqués par **0A0-PIM**. Pour **0A0-PHEA** et **0A0-OAc** (alors que ce dernier est injecté à partir d'une solution concentrée dans le DMSO), aucune surmortalité n'est observée par rapport à l'échantillon de référence. Cette observation pourrait limiter l'intérêt de la sonde polycationique pour des applications en bio-imagerie.

IV.2.b) Cellules CHO-K1

Dans le cas des cellules CHO-K1, on observe également une localisation des deux sondes étudiées dans les lysosomes. Toutefois, cette localisation s'accompagne également d'une accumulation en périphérie du noyau dans le cas de **0A0-PIM**. Cependant, la surmortalité cellulaire observée dans les échantillons nécessite de nouvelles expériences pour confirmer ces observations.

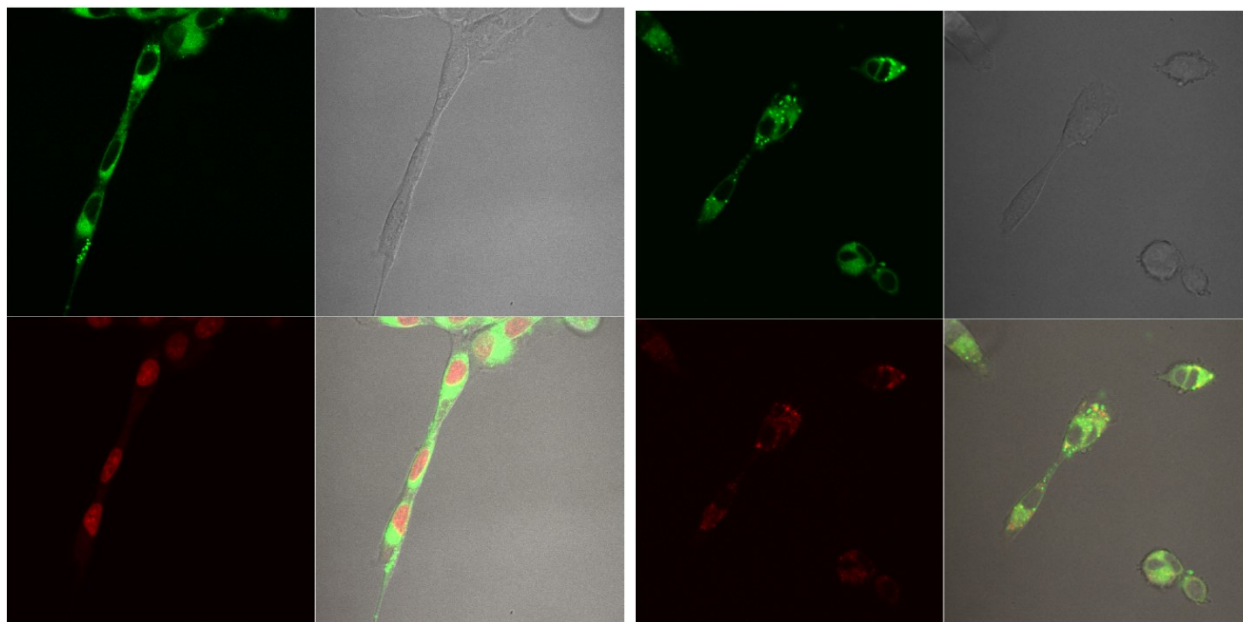


Figure 4- 22 : (gauche) co-marquage : 0A0-OAC (vert) et DRAQ5 (rouge) cellule F98, (droite) co-marquage : 0A0-OAc (vert) et lyso tracker red (rouge) cellule F98.

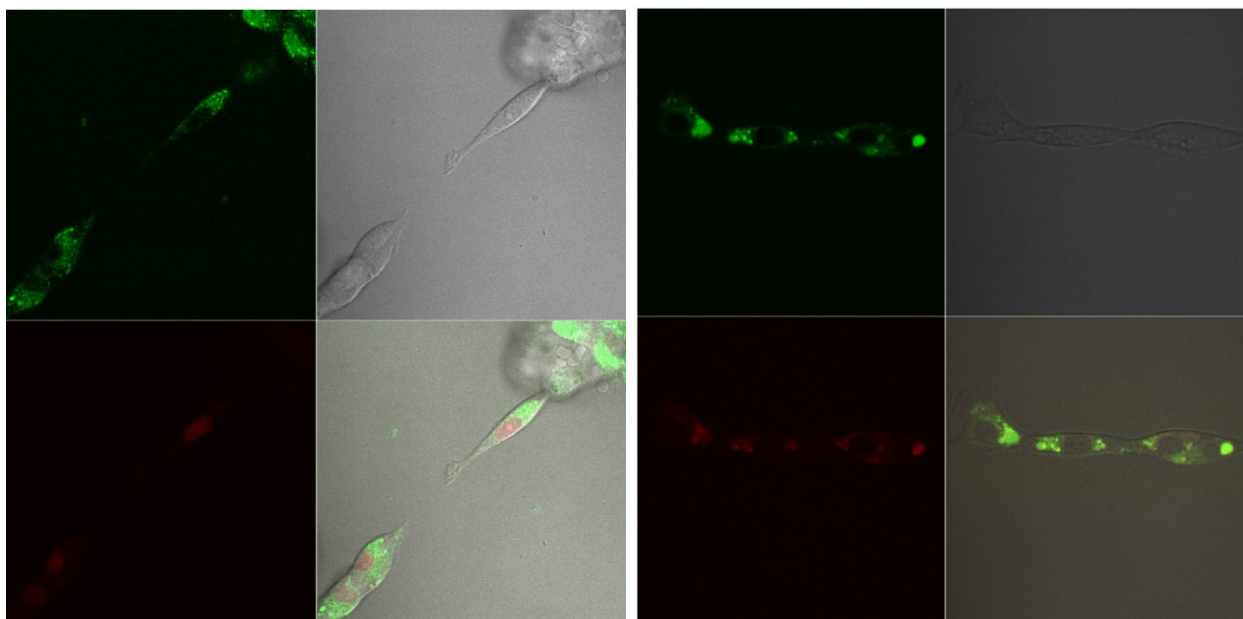


Figure 4- 23 : (gauche) co-marquage : 0A0-PHEA (vert) et DRAQ5 (rouge) cellule F98, (droite) co-marquage : 0A0-PHEA (vert) et lyso tracker red (rouge) cellule F98.

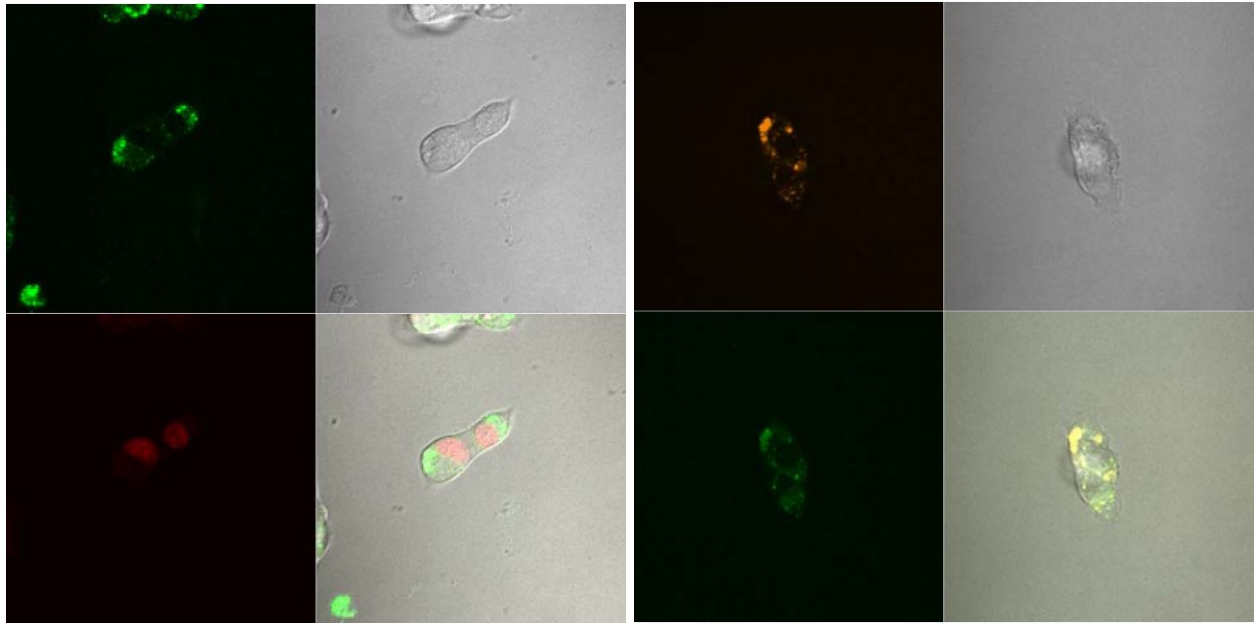


Figure 4- 24 : (gauche) co-marquage 0A0-PIM (vert) et DRAQ5 (rouge) cellule F98, (droite) co-marquage : 0A0-PIM (vert) et lyso tracker red (rouge) cellule F98.

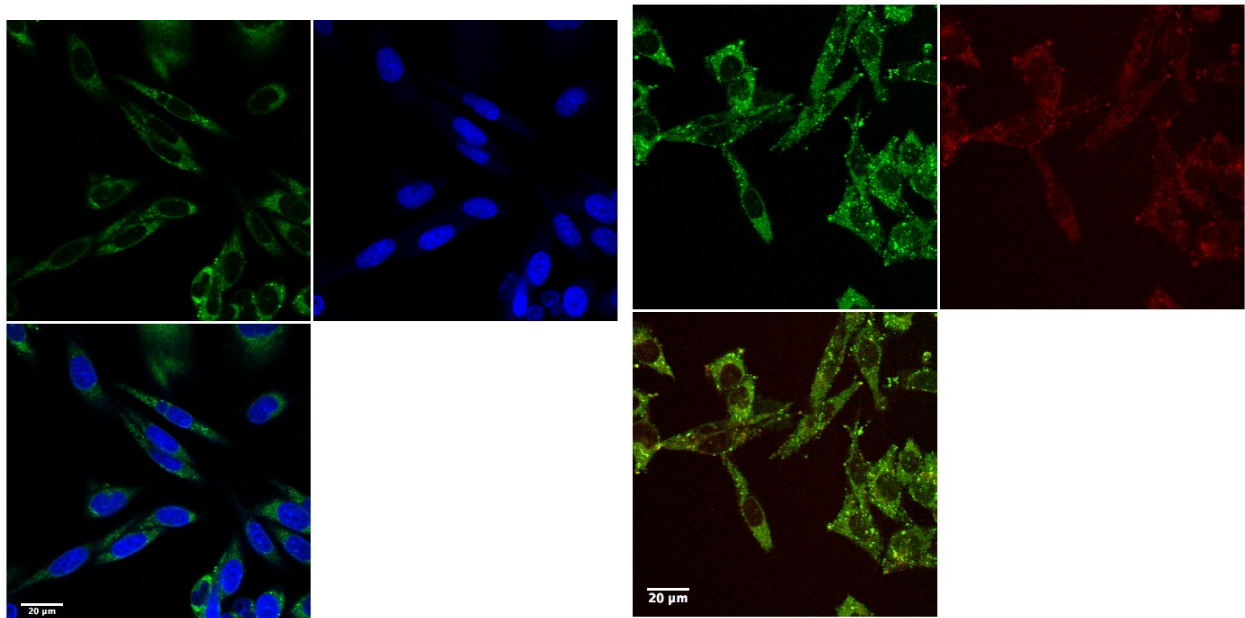


Figure 4- 25 : Co-marquage : 0A0-PHEA (vert) et DRAQ5 (bleu) cellule CHO-K1 (gauche), co-marquage : 0A0-PHEA (vert) et lyso tracker red (rouge) cellule CHO-K1 (droite).

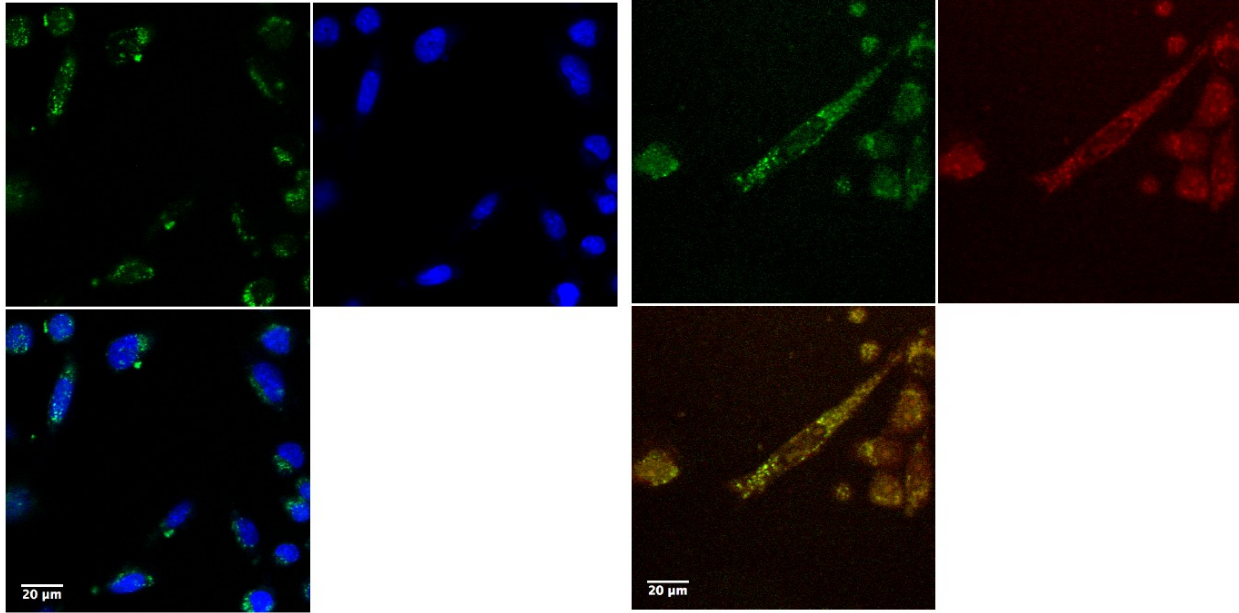


Figure 4- 26 : Co-marquage : 0A0-PIM (vert) et DRAQ5 (rouge) cellule CHO-K1 (gauche), co-marquage : 0A0-PIM (vert) (droite) et lyso tracker red (rouge) cellule CHO-K1.

IV.2.c) Co-localisation

Pour quantifier la co-localisation entre les marqueurs et les chromophores étudiés, des calculs ont été réalisés en utilisant la formule suivante :

$$C_f = \frac{N_{pc}}{(N_1 + N_2) - N_{pc}} \times 100$$

avec :

- C_f : facteur de colocalisation,
- N_1 : nombre de pixels associés au chromophore anthracène étudié,
- N_2 : nombre de pixels associés au marqueur utilisé,
- N_{pc} : nombre de pixels associés simultanément aux deux marqueurs (colocalisés).

On peut voir que dans les cellules F98, **0A0-OAc** et **0A0-PHEA** possèdent le même facteur de colocalisation de l'ordre de 40% avec les lysosomes (Figure 4- 27 et Figure 4- 28). Dans les cellules CHO-K1 on observe une meilleure pénétration au sein du noyau (Figure 4- 29 et Figure 4- 30). Le chromophore **0A0-PHEA** montre une colocalisation de 12% dans le noyau et de 30% dans les lysosomes. Dans ces dernières cellules, **0A0-PIM** montre des résultats bien supérieurs pour le marquage des noyaux avec une colocalisation de 30% dans les lysosomes, mais de 40% dans le noyau. Ce résultat montre que le chromophore **0A0-PIM** permet de marquer les zones riches en ADN (Tableau 4- 4). Ce résultat est à confirmer car, encore une fois, la mortalité cellulaire observée

pourrait expliquer un passage plus facile dans le noyau, la mort cellulaire s'accompagnant d'une perméabilisation des membranes.

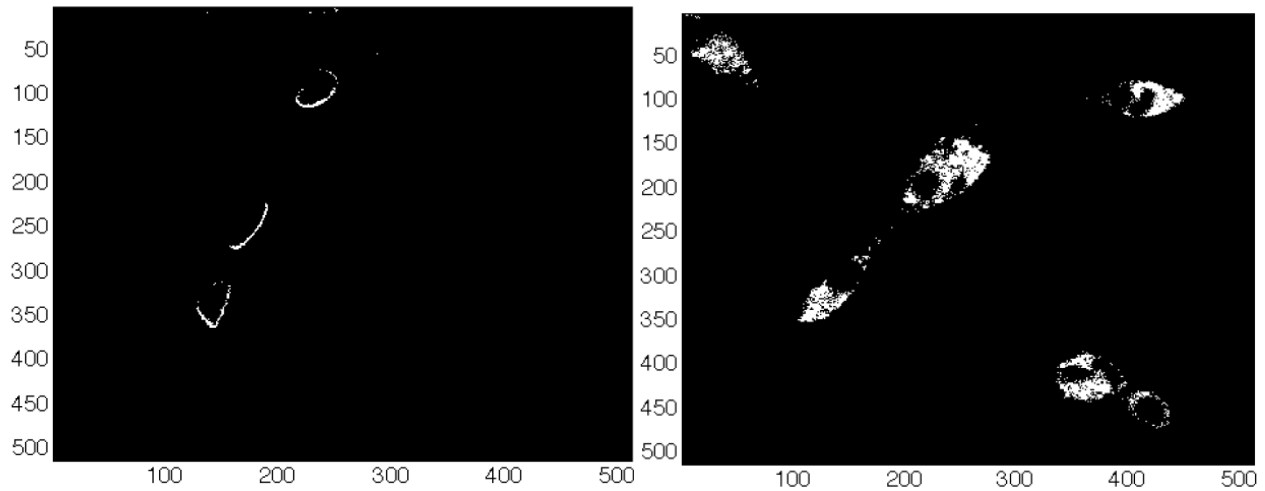


Figure 4- 27 : Co-localisation dans les cellules F98. Gauche) 0A0-OAc vs DRAQ5, droite) 0A0-OAc vs Lyso.

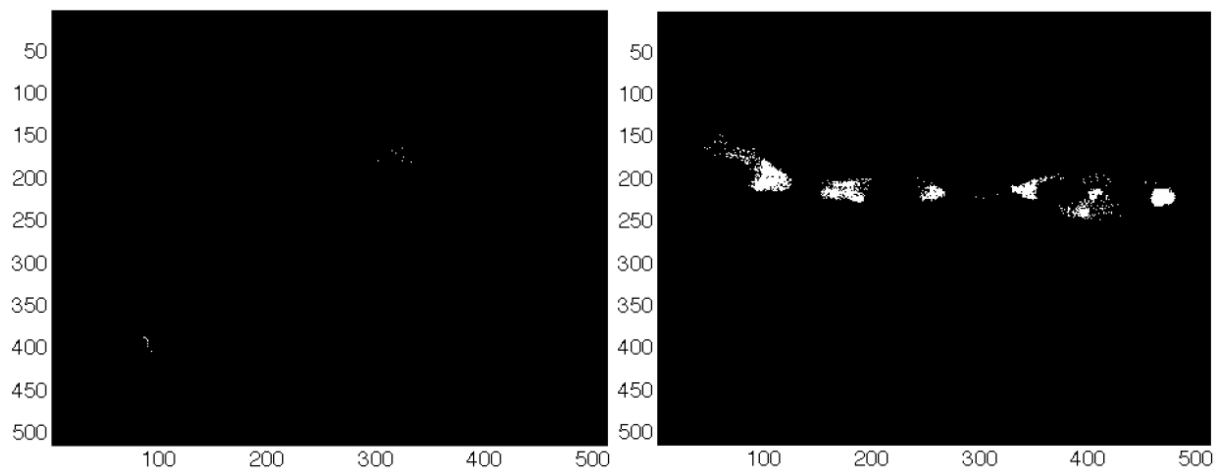


Figure 4- 28 : Co-localisation dans les cellules F98. Gauche) 0A0-PHEA vs DRAQ5, droite) 0A0-PHEA vs Lyso.

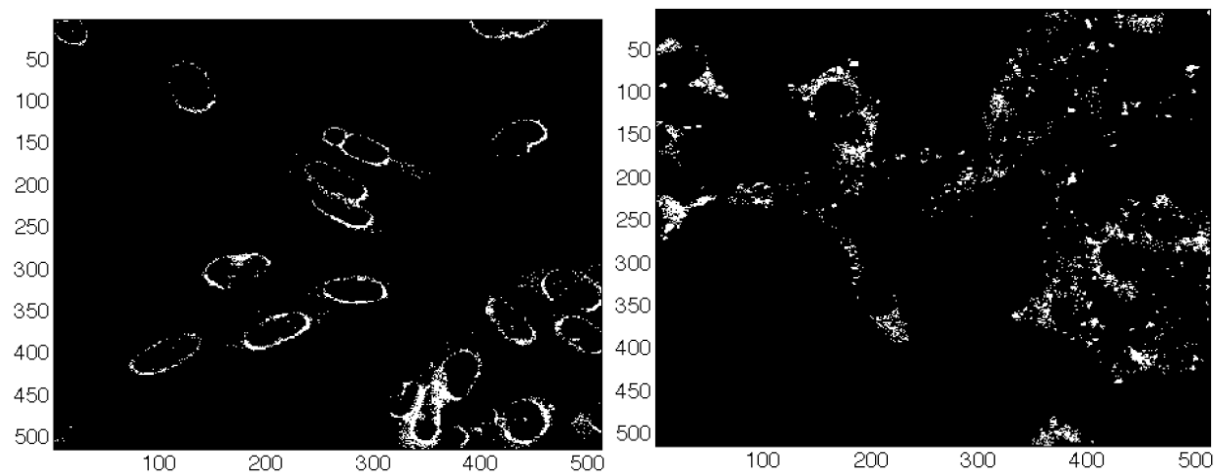


Figure 4- 29 : CHOK1 0A0-PHEA DRAQ5 Lyso.

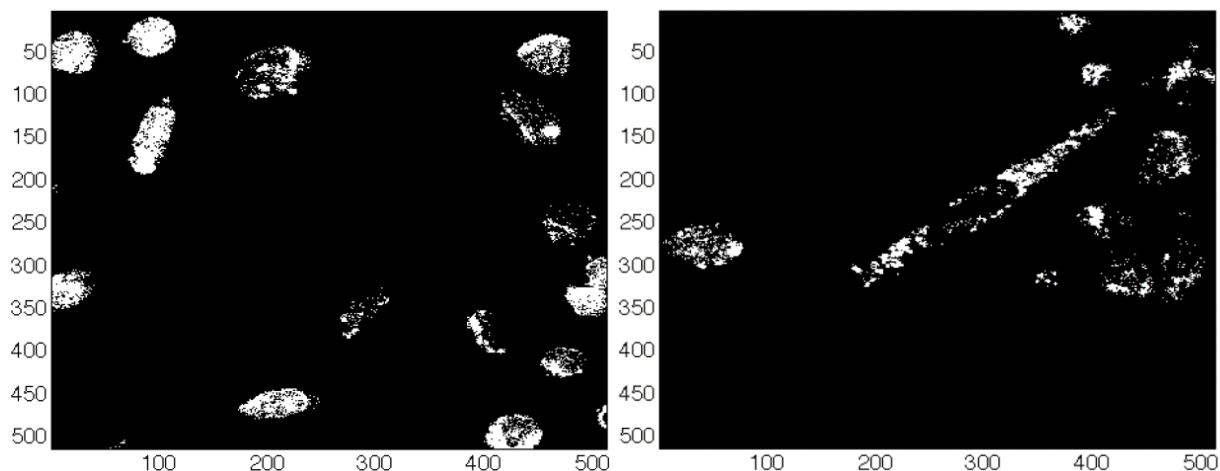


Figure 4- 30 : CHOK1 0A0-PIM DRAQ5 Lyso.

Lignée cellulaire	Chromophore	Marqueur	Co-localisation (%)
F 98	0A0-OAc	DRAQ 5	4,26
		Lysotracker Red	40,43
	0A0-PHEA	DRAQ 5	1,09
		Lysotracker Red	43,13
CHO-K1	0A0-PHEA	DRAQ 5	12,02
		Lysotracker Red	29,74
	0A0-PIM	DRAQ 5	40,89
		Lysotracker Red	32,14

Tableau 4- 4 : Valeurs du facteur de colocalisation.

IV.2.d) Imagerie *in vivo*

Finalement, une étude préliminaire d'imagerie *in vivo* a été réalisée sur ce nouveau chromophore afin de la comparer avec **0A0-PHEA** et **0A-0A-PHEA**. Le but en était de déterminer l'influence des chaînes polycationiques sur les paramètres de circulation de la sonde en milieu biologique. Des images d'angiographie ont été réalisées (Figure 4- 31). Aucune toxicité n'a été observée sur l'animal pendant le temps de mesure. Alors que la fluorescence est collectée quasi exclusivement sur le canal rouge pour **0A-0A-PHEA** et jaune pour **0A0-PHEA**, elle est collectée de manière à peu près équivalente sur ces deux canaux pour **0A0-PIM**. **0A0-PIM** permet d'imager avec craniotomie à une profondeur de 450 μm , soit une valeur comparable à **0A0-PHEA**, mais inférieure

à **0A-0A-PHEA** avec lequel on atteint 620 μm . L'image laisse apparaître une circulation seulement temporaire dans les vaisseaux sanguins avec un franchissement progressif de la barrière hémato-encéphalique. Ainsi, sur la Figure 4- 31, on peut voir très clairement la diffusion du colorant à partir des vaisseaux. Ce passage de la BHE est probablement attribuable à la structure poly(cationique) de la sonde qui soit permet un phénomène d'endocytose, soit utilise la perméabilité des vaisseaux sanguins. La méthodologie développée ici peut être appliquée à d'autres chromophores ou molécules d'intérêt biologique dont on souhaite qu'ils franchissent cette barrière.

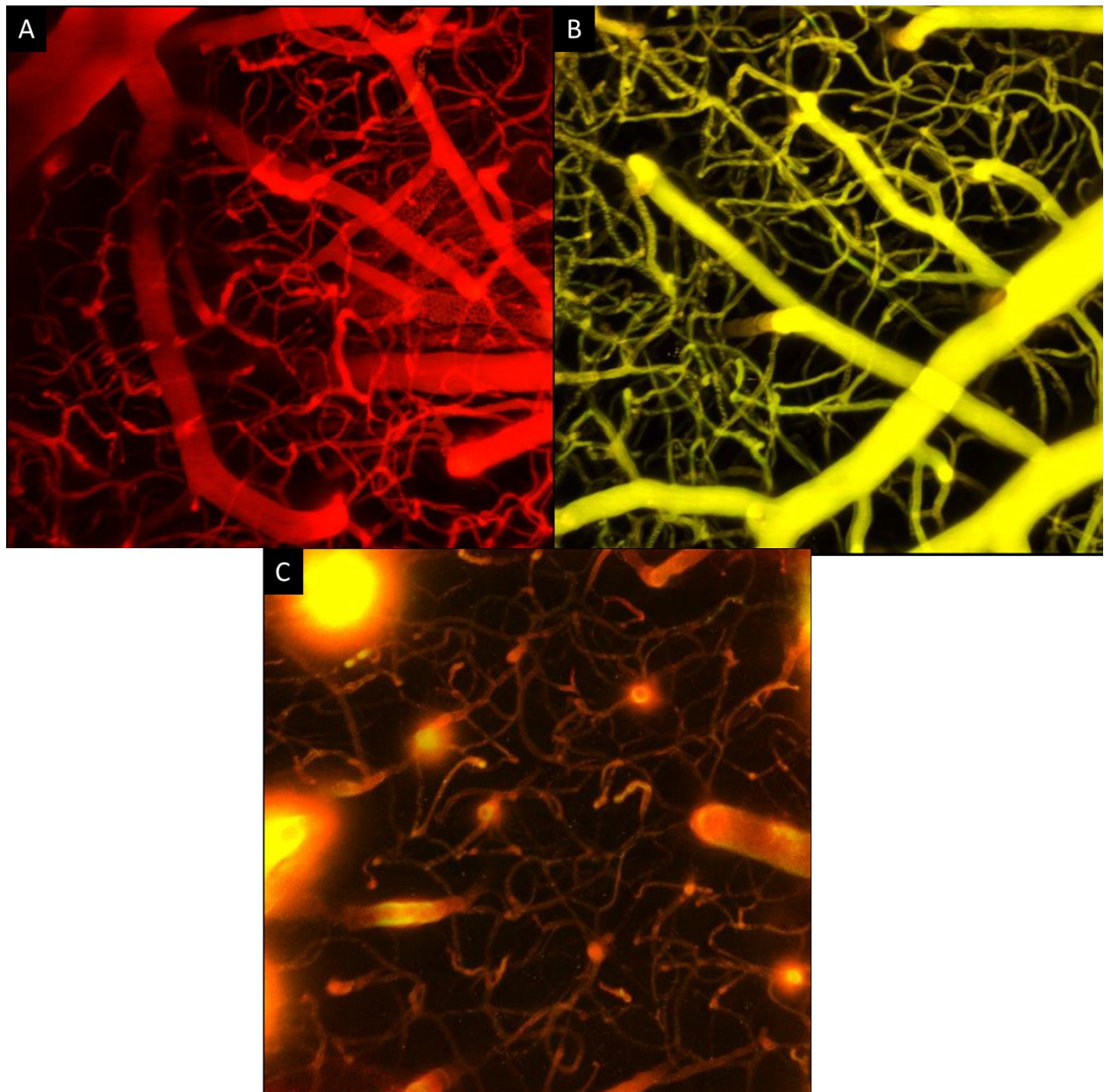


Figure 4- 31 : Observation de la vascularisation sanguine grâce à a) 0A-A0-PHEA, b) 0A0-PHEA et c) 0A0-PIM du cerveau d'une souris (avec craniotomie).

Il est intéressant de voir qu'après mise à mort de la souris les analyses *ex vivo* des organes montrent des résultats différents dans le foie et dans le rein (Figure 4- 32). Dans le rein, **0A0-PIM** et **0A-A0-PHEA** émettent dans le rouge et **0A0-PHEA** dans le jaune. **0A0-PIM** marque nettement les micro-vaisseaux sans marquer les glomérules qui sont en revanche marqués avec les autres chromophores. Dans le foie les trois chromophores émettent dans des zones différentes **0A-A0-PHEA** dans le rouge **0A0-PIM** dans le jaune et **0A0-PHEA** dans le vert. Là encore, le marquage par **0A0-PIM** est différent de celui observé avec les deux autres chromophores. Le marquage des hépatocytes en bordure n'est pas observé alors que l'on observe les micro-vaisseaux. Cette expérience confirme l'intérêt de la modification de l'enveloppe polymère pour réaliser des marquages spécifiques.

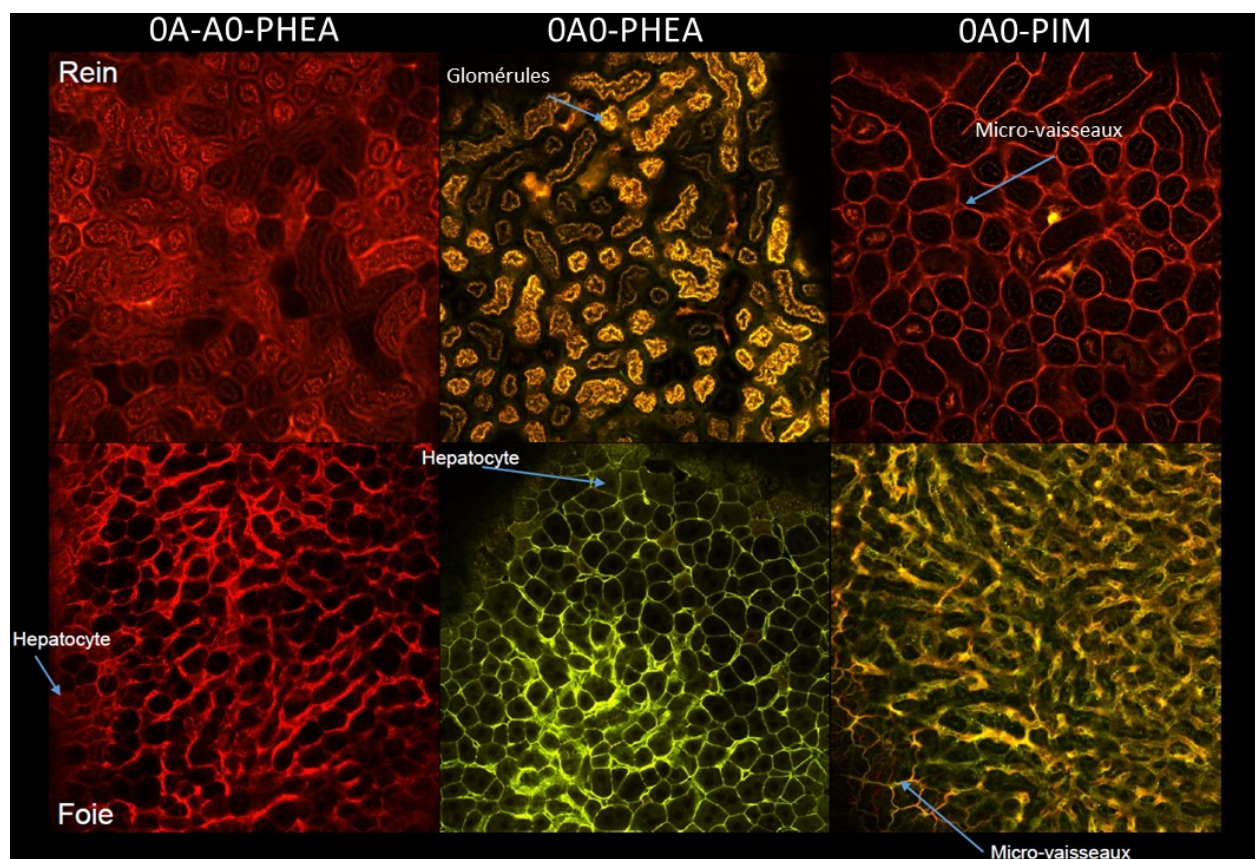


Figure 4- 32 : Analyse ex-vivo comparative du foie et du rein pour 0A-A0-PHEA 0A0-PHEA et 0A0-PIM.

V Conclusion

Le but de cette étude de substitution des chaînes polymère PHEA en PIM était de modifier les propriétés de marquage et de pénétration cellulaire de la sonde résultante, **0A0-PHEA** étant exclusivement un marqueur vasculaire n'ayant aucune propriété de ciblage spécifiques.

Nous avons montré que **0A0-PIM** possède des propriétés nettement différentes. Des études de complexation des chromophores avec l'ADN ont montré des interactions assez similaires en terme de localisation et de magnitude (sillon mineur/constante d'association) mais impliquant des phénomènes différents (électrostatiques). Des différences d'internalisation ont été observées, mais les résultats demandent à être confirmés à cause de la mortalité cellulaire partielle observée. L'étude *in vivo*, bien que relativement préliminaire, suggère un certain potentiel pour ce type de sondes. En effet, les chaînes polycationiques ajoutées au chromophore permettent de franchir rapidement la barrière hématoencéphalique, réputée relativement imperméable. Cette propriété pourrait être mise à profit dans le cadre de l'acheminement de molécules d'intérêt biologiques au sein des tissus cérébraux. De plus, les analyses *ex vivo* montrent un marquage assez "propre" et permanent de certains vaisseaux, en particulier la microvascularisation du foie et les vaisseaux entourant les tubules des reins. Ces résultats valident la stratégie de modification des chaînes latérales pour obtenir des sondes aux propriétés de ciblage différentes.

Conclusion et perspectives

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à des aspects concernant à la fois l'ingénierie moléculaire de chromophores (chapitre 2 et première partie du chapitre 3), et leur vectorisation en milieu biologiques, en travaillant à la fois sur leur hydrosolubilité/biocompatibilité et sur la sélectivité du marquage (deuxième partie du chapitre 3 et chapitre 4). Le chapitre 1 a ainsi permis de mettre en évidence des règles importantes d'ingénierie moléculaire afin d'améliorer les figures de mérite des composés quadripolaires pour la PTD-ADP. Ce travail d'ingénierie moléculaire a permis en particulier de montrer que le critère crucial déterminant l'efficacité d'un photosensibilisateur est un positionnement adéquat des groupements générateurs d'oxygène singulet (atomes lourds) sur la structure. Le travail sur la longueur de conjugaison et la symétrie nous a permis également de procéder à un contrôle fin sur les propriétés spectroscopiques des objets synthétisés. Nous avons ainsi pu identifier un composé particulièrement intéressant, **02-20**, combinant une section efficace importante dans la zone de transparence biologique, un bon rendement de fluorescence proche de la FTB et un rendement de génération d'oxygène singulet de 50%. Ce composé (02-20) a été testé *in-cellulo* pour montrer sa toxicité sous irradiation. Ce composé a été hydrosolubilisé par une micelle polymère liée de manière covalente. Des tests *in vivo* doivent être menés avec ce composé pour voir si des applications en thérapie sont possibles (localisation et toxicité photo-induite). Ce composé hydrosoluble a aussi été testé pour des études de micro-fabrication par polymérisation induite par génération d'oxygène singulet sur de l'ADN. Ces travaux sont actuellement en cours de développement.

Les études spectroscopiques menées dans le cadre de l'étude d'ingénierie moléculaire nous ont permis de mettre en évidence que l'introduction d'un pont central di-yne dans les composés quadripolaires permettaient de décaler les longueurs d'onde d'absorption et d'émission vers le rouge en augmentant significativement le déplacement de Stokes. Ce concept a été mis en pratique dans le chapitre 3, pour la synthèse de chromophores fluorescents pour des applications en microscopie de fluorescence à deux photons. Le chromophore dont la fluorescence était la plus décalée dans la fenêtre de transparence biologique (**0A-A0**) a été utilisé dans la deuxième partie du chapitre 3 dans le cadre d'imagerie intravitale de la vascularisation cérébrale par microscopie biphotonique de fluorescence. Cette sonde s'est avérée particulièrement prometteuse sur deux aspects. Le premier est la possibilité d'obtention d'images d'angiographie profondes et contrastées sans craniotomie. Ce résultat illustre l'importance d'une absorption et d'une émission aussi décalées que possible au sein de la fenêtre de transparence biologique. Le deuxième résultat est que ce chromophore s'accumule au sein des cellules endothéliales : cette propriété non reportée à notre connaissance dans la littérature pour des chromophores fluorescents à deux photons est particulièrement prometteuse pour des applications en imagerie de microvascularisation de tumeurs cérébrales.

Pour permettre ce type d'applications, de nouveaux chromophores possédant une émission différente de **0A-A0** ont été modifiés pour les rendre hydrosoluble, dans la dernière partie du chapitre 3. Des études préliminaires sont en cours pour vérifier leurs propriétés de localisation au sein des cellules endothéliales ce qui devrait permettre de suivre l'action de traitement anticancéreux sur une tumeur. Une perspective est de voir si le dérivé **02-20_PHEA** ne présentera pas la même sélectivité pour les cellules endothéliales. Si c'est le cas, il pourrait être utilisé pour détruire des vaisseaux sanguins irriguant une tumeur[149].

Enfin, nous avons envisagé dans le chapitre 4 des modifications des chaînes polymères pour modifier la sélectivité des chromophores pour la TPLSFM. La substitution des fonctions hydroxyles latérales des polymères par des fonctions imidazoliums a été menée, mais la méthodologie développée pourrait être généralisée à un grand nombre de groupements nucléophiles. Les résultats des études *in vitro* et *in cellulo* de ces nouveaux poly(cations) sont assez contrastés et ne montrent pas une capacité significativement plus importante à franchir la paroi cellulaire ou à complexer plus fortement l'ADN. Cependant, ces systèmes pourraient présenter un intérêt spécifique pour le passage des membranes de cellules procaryotes, spécifiquement Gram(-

), dont des études récentes ont montré qu'elles présentaient une affinité très marquée pour les poly(cations) du fait de leur constitution membranaire particulière. On peut envisager, après modification du cœur du chromophore de proposer un traitement antibactérien basé sur la photoactivation pour ces bactéries, suivant une approche récemment introduite par différentes équipes de recherche biomédicale[339]. Il apparaît intéressant de continuer à développer des nouveaux chromophores avec d'autres groupements et d'en étudier directement le comportement *in vivo*. L'introduction de sucre pourrait être une alternative pour faire du ciblage de cellules cancéreuses tout en gardant le caractère hydrosoluble de la sonde.

Bibliographie

- [1] Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy: Springer Science & Business Media; 2013.
- [2] Valeur B. Molecular Fluorescence: Principles and Applications. Wiley-VCH, Weinheim. 2012.
- [3] Banwell CN, McCash EM. Fundamentals of molecular spectroscopy: McGraw-Hill London; 1983.
- [4] Hollas JM. Modern spectroscopy: John Wiley & Sons; 2004.
- [5] Hilborn RC. Einstein coefficients, cross sections, f values, dipole moments, and all that. arXiv preprint physics/0202029. 2002.
- [6] Göppert-Mayer M. Elementary processes with two quantum transitions. Annalen der Physik. 2009;18:466-79.
- [7] Kaiser W, Garrett C. Two-Photon Excitation in Ca F 2: Eu 2+. Physical review letters. 1961;7:229.
- [8] Hecht J. Short history of laser development. OPTICE. 2010;49:091002--23.
- [9] He GS, Tan L-S, Zheng Q, Prasad PN. Multiphoton absorbing materials: molecular designs, characterizations, and applications. Chemical Reviews. 2008;108:1245-330.
- [10] Beljonne D, Wenseleers W, Zojer E, Shuai Z, Vogel H, Pond SJ, et al. Role of dimensionality on the two-photon absorption response of conjugated molecules: the case of octupolar compounds. Advanced Functional Materials. 2002;12:631-41.
- [11] Belfield KD, Hagan DJ, Van Stryland EW, Schafer KJ, Negres RA. New two-photon absorbing fluorene derivatives: Synthesis and nonlinear optical characterization. Organic Letters. 1999;1:1575-8.
- [12] Pond SJ, Rumi M, Levin MD, Parker TC, Beljonne D, Day MW, et al. One-and two-photon spectroscopy of donor-acceptor-donor distyrylbenzene derivatives: effect of cyano substitution and distortion from planarity. The Journal of Physical Chemistry A. 2002;106:11470-80.
- [13] Rumi M, Barlow S, Wang J, Perry JW, Marder SR. Two-photon absorbing materials and two-photon-induced chemistry. Photoresponsive Polymers I: Springer; 2008. p. 1-95.
- [14] Pawlicki M, Collins HA, Denning RG, Anderson HL. Two-Photon Absorption and the Design of Two-Photon Dyes. Angewandte Chemie International Edition. 2009;48:3244-66.
- [15] Myung Kim H, Rae Cho B. Two-photon materials with large two-photon cross sections. Structure-property relationship. Chemical Communications. 2009:153-64.
- [16] Antonov L, Kamada K, Ohta K, Kamounah FS. A systematic femtosecond study on the two-photon absorbing D- π -A molecules- π -bridge nitrogen insertion and strength of the donor and acceptor groups. Phys Chem Chem Phys. 2003;5:1193-7.
- [17] Albota M, Beljonne D, Brédas J-L, Ehrlich JE, Fu J-Y, Heikal AA, et al. Design of organic molecules with large two-photon absorption cross sections. Science. 1998;281:1653-6.

- [18] Rumi M, Ehrlich JE, Heikal AA, Perry JW, Barlow S, Hu Z, et al. Structure-property relationships for two-photon absorbing chromophores: bis-donor diphenylpolyene and bis (styryl) benzene derivatives. *Journal of the American Chemical Society*. 2000;122:9500-10.
- [19] Chung S-J, Kim K-S, Lin T-C, He GS, Swiatkiewicz J, Prasad PN. Cooperative enhancement of two-photon absorption in multi-branched structures. *The Journal of Physical Chemistry B*. 1999;103:10741-5.
- [20] Katan C, Terenziani F, Mongin O, Werts MH, Porres L, Pons T, et al. Effects of (multi) branching of dipolar chromophores on photophysical properties and two-photon absorption. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2005;109:3024-37.
- [21] Drobizhev M, Karotki A, Dzenis Y, Rebane A, Suo Z, Spangler CW. Strong cooperative enhancement of two-photon absorption in dendrimers. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2003;107:7540-3.
- [22] Xu B, Fang H, Chen F, Lu H, He J, Li Y, et al. Synthesis, characterization, two-photon absorption, and optical limiting properties of triphenylamine-based dendrimers. *New Journal of Chemistry*. 2009;33:2457-64.
- [23] Drobizhev M, Karotki A, Rebane A, Spangler CW. Dendrimer molecules with record large two-photon absorption cross section. *Opt Lett*. 2001;26:1081-3.
- [24] Spano FC. Excitons in conjugated oligomer aggregates, films and crystals. *Annual Review of Physical Chemistry*. 2006;57:217-43.
- [25] Fortrie R, Anemian R, Stephan O, Mulatier J-C, Baldeck PL, Andraud C, et al. Enhancement of two-photon absorption via oligomerization. A route for the engineering of two-photon absorbers in the visible range. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2007;111:2270-9.
- [26] Chung S-J, Zheng S, Odani T, Beverina L, Fu J, Padilha LA, et al. Extended squaraine dyes with large two-photon absorption cross-sections. *Journal of the American Chemical Society*. 2006;128:14444-5.
- [27] Cho BR, Son KH, Lee SH, Song Y-S, Lee Y-K, Jeon S-J, et al. Two Photon Absorption Properties of 1,3,5-Tricyano-2,4,6-tris(styryl)benzene Derivatives. *Journal of the American Chemical Society*. 2001;123:10039-45.
- [28] Porres L, Mongin O, Katan C, Charlot M, Pons T, Mertz J, et al. Enhanced two-photon absorption with novel octupolar propeller-shaped fluorophores derived from triphenylamine. *Organic letters*. 2004;6:47-50.
- [29] Le Droumaguet C, Mongin O, Werts MHV, Blanchard-Desce M. Towards "smart" multiphoton fluorophores: strongly solvatochromic probes for two-photon sensing of micropolarity. *Chemical Communications*. 2005:2802-4.
- [30] Audebert P, Kamada K, Matsunaga K, Ohta K. The third-order NLO properties of D- π -A molecules with changing a primary amino group into pyrrole. *Chemical physics letters*. 2003;367:62-71.
- [31] Rubio-Pons Ò, Luo Y, Ågren H. Effects of conjugation length, electron donor and acceptor strengths on two-photon absorption cross sections of asymmetric zinc-porphyrin derivatives. *The Journal of Chemical Physics*. 2006;124:094310.
- [32] Strehmel B, Sarker AM, Detert H. The Influence of σ and π Acceptors on Two-Photon Absorption and Solvatochromism of Dipolar and Quadrupolar Unsaturated Organic Compounds. *ChemPhysChem*. 2003;4:249-59.
- [33] Genin E, Hugues V, Clermont G, Herbivo C, Castro MCR, Comel A, et al. Fluorescence and two-photon absorption of push-pull aryl (bi) thiophenes: structure-property relationships. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2012;11:1756-66.

- [34] Mongin O, Brunel J, Porrès L, Blanchard-Desce M. Synthesis and two-photon absorption of triphenylbenzene-cored dendritic chromophores. *Tetrahedron Letters*. 2003;44:2813-6.
- [35] Tolbert LM, Zhao X. Beyond the Cyanine Limit: Peierls Distortion and Symmetry Collapse in a Polymethine Dye. *Journal of the American Chemical Society*. 1997;119:3253-8.
- [36] Belfield KD, Morales AR, Hales JM, Hagan DJ, Van Stryland EW, Chapela VM, et al. Linear and two-photon photophysical properties of a series of symmetrical diphenylaminofluorenes. *Chemistry of materials*. 2004;16:2267-73.
- [37] Lee S, Thomas KJ, Thayumanavan S, Bardeen CJ. Dependence of the two-photon absorption cross section on the conjugation of the phenylacetylene linker in dipolar donor-bridge-acceptor chromophores. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2005;109:9767-74.
- [38] Mongin O, Porres L, Charlot M, Katan C, Blanchard-Desce M. Synthesis, Fluorescence, and Two-Photon Absorption of a Series of Elongated Rodlike and Banana-Shaped Quadrupolar Fluorophores: A Comprehensive Study of Structure–Property Relationships. *Chemistry-a European Journal*. 2007;13:1481-98.
- [39] Aihara J-i. Reduced HOMO–LUMO Gap as an Index of Kinetic Stability for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *The Journal of Physical Chemistry A*. 1999;103:7487-95.
- [40] Kaur I, Jia W, Kopreski RP, Selvarasah S, Dokmeci MR, Pramanik C, et al. Substituent Effects in Pentacenes: Gaining Control over HOMO–LUMO Gaps and Photooxidative Resistances. *Journal of the American Chemical Society*. 2008;130:16274-86.
- [41] Jablonski A. *Nature* 131, 839 (1933). Jablonski, A: *Z Physik*. 1935;94:38.
- [42] Fery-Forgues S, Lavabre D. Are Fluorescence Quantum Yields So Tricky to Measure? A Demonstration Using Familiar Stationery Products. *Journal of Chemical Education*. 1999;76:1260.
- [43] Berezin MY, Achilefu S. Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging. *Chemical Reviews*. 2010;110:2641-84.
- [44] Lakowicz JR, Szmajcinski H, Nowaczyk K, Berndt KW, Johnson M. Fluorescence lifetime imaging. *Analytical Biochemistry*. 1992;202:316-30.
- [45] Sarder P, Maji D, Achilefu S. Molecular Probes for Fluorescence Lifetime Imaging. *Bioconjugate Chemistry*. 2015.
- [46] Kwiatek JM, Owen DM, Abu-Siniyeh A, Yan P, Loew LM, Gaus K. Characterization of a new series of fluorescent probes for imaging membrane order. *PloS one*. 2013;8:e52960.
- [47] Kamlet MJ, Abboud JLM, Abraham MH, Taft RW. Linear solvation energy relationships. 23. A comprehensive collection of the solvatochromic parameters, ρ^* , α , and β , and some methods for simplifying the generalized solvatochromic equation. *The Journal of Organic Chemistry*. 1983;48:2877-87.
- [48] Huang G-J, Ho J-H, Prabhakar C, Liu Y-H, Peng S-M, Yang J-S. Site-Selective Hydrogen-Bonding-Induced Fluorescence Quenching of Highly Solvatochromic GFP-like Chromophores. *Organic Letters*. 2012;14:5034-7.
- [49] Mataga N, Kaifu Y, Koizumi M. Solvent effects upon fluorescence spectra and the dipolemoments of excited molecules. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 1956;29:465-70.
- [50] Grabowski ZR, Rotkiewicz K, Rettig W. Structural Changes Accompanying Intramolecular Electron Transfer: Focus on Twisted Intramolecular Charge-Transfer States and Structures. *Chemical Reviews*. 2003;103:3899-4032.
- [51] Bagchi B, Oxtoby DW, Fleming GR. Theory of the time development of the stokes shift in polar media. *Chemical Physics*. 1984;86:257-67.
- [52] Massin J, Charaf-Eddin A, Appaix F, Bretonniere Y, Jacquemin D, Van Der Sanden B, et al. A water soluble probe with near infrared two-photon absorption and polarity-induced fluorescence for cerebral vascular imaging. *Chemical Science*. 2013;4:2833-43.

- [53] Lavrentovich OD. Confocal Fluorescence Microscopy. Characterization of Materials: John Wiley & Sons, Inc.; 2002.
- [54] Stephens DJ, Allan VJ. Light Microscopy Techniques for Live Cell Imaging. *Science*. 2003;300:82-6.
- [55] Huang D, Chen Y, Zhao J. Access to a large stokes shift in functionalized fused coumarin derivatives by increasing the geometry relaxation upon photoexcitation: An experimental and theoretical study. *Dyes and Pigments*. 2012;95:732-42.
- [56] Araneda JF, Piers WE, Heyne B, Parvez M, McDonald R. High Stokes Shift Anilido-Pyridine Boron Difluoride Dyes. *Angewandte Chemie International Edition*. 2011;50:12214-7.
- [57] Wu Y-Y, Chen Y, Gou G-Z, Mu W-H, Lv X-J, Du M-L, et al. Large Stokes Shift Induced by Intramolecular Charge Transfer in N,O-Chelated Naphthyridine-BF₂ Complexes. *Organic Letters*. 2012;14:5226-9.
- [58] Peng X, Song F, Lu E, Wang Y, Zhou W, Fan J, et al. Heptamethine cyanine dyes with a large stokes shift and strong fluorescence: a paradigm for excited-state intramolecular charge transfer. *Journal of the American Chemical Society*. 2005;127:4170-1.
- [59] Rettig W. Photophysical and photochemical switches based on twisted intramolecular charge transfer (TICT) states. *Applied Physics B*. 1988;45:145-9.
- [60] Yoshihara T, Druzhinin SI, Zachariasse KA. Fast Intramolecular Charge Transfer with a Planar Rigidized Electron Donor/Acceptor Molecule. *Journal of the American Chemical Society*. 2004;126:8535-9.
- [61] Guido CA, Mennucci B, Jacquemin D, Adamo C. Planar vs. twisted intramolecular charge transfer mechanism in Nile Red: new hints from theory. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2010;12:8016-23.
- [62] Chen Y, Zhao J, Guo H, Xie L. Geometry Relaxation-Induced Large Stokes Shift in Red-Emitting Borondipyrromethenes (BODIPY) and Applications in Fluorescent Thiol Probes. *The Journal of Organic Chemistry*. 2012;77:2192-206.
- [63] Pavlovich VS. Solvatochromism and Nonradiative Decay of Intramolecular Charge-Transfer Excited States: Bands-of-Energy Model, Thermodynamics, and Self-Organization. *ChemPhysChem*. 2012;13:4081-93.
- [64] Felouat A, D'Aléo A, Charaf-Eddin A, Jacquemin D, Le Guennic B, Kim E, et al. Tuning the Direction of Intramolecular Charge Transfer and the Nature of the Fluorescent State in a T-Shaped Molecular Dyad. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2015;119:6283-95.
- [65] Gallavardin T, Armagnat C, Maury O, Baldeck PL, Lindgren M, Monnereau C, et al. An improved singlet oxygen sensitizer with two-photon absorption and emission in the biological transparency window as a result of ground state symmetry-breaking. *Chemical Communications*. 2012;48:1689-91.
- [66] Vollmer F, Rettig W, Birckner E. Photochemical mechanisms producing large fluorescence stokes shifts. *J Fluoresc*. 1994;4:65-9.
- [67] Lavis LD, Raines RT. Bright Ideas for Chemical Biology. *ACS Chemical Biology*. 2008;3:142-55.
- [68] Beechem JM, Brand L. Time-resolved fluorescence of proteins. *Annual review of biochemistry*. 1985;54:43-71.
- [69] Spence MTZ, Johnson ID. *The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*: Live Technologies Corporation; 2010.
- [70] Jakobs S. High resolution imaging of live mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2006;1763:561-75.

- [71] Chen X, Bi Y, Wang T, Li P, Yan X, Hou S, et al. Lysosomal Targeting with Stable and Sensitive Fluorescent Probes (Superior LysoProbes): Applications for Lysosome Labeling and Tracking during Apoptosis. *Sci Rep.* 2015;5.
- [72] Wang S, Li N, Pan W, Tang B. Advances in functional fluorescent and luminescent probes for imaging intracellular small-molecule reactive species. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2012;39:3-37.
- [73] Nadler A, Schultz C. The Power of Fluorogenic Probes. *Angewandte Chemie International Edition.* 2013;52:2408-10.
- [74] Jares-Erijman EA, Jovin TM. FRET imaging. *Nature biotechnology.* 2003;21:1387-95.
- [75] Quek C-H, Leong KW. Near-Infrared Fluorescent Nanoprobes for in Vivo Optical Imaging. *Nanomaterials.* 2012;2:92-112.
- [76] Hilderbrand SA, Weissleder R. Near-infrared fluorescence: application to in vivo molecular imaging. *Current Opinion in Chemical Biology.* 2010;14:71-9.
- [77] Ptaszek M. Chapter Three - Rational Design of Fluorophores for In Vivo Applications. In: May CM, editor. *Progress in Molecular Biology and Translational Science: Academic Press;* 2013. p. 59-108.
- [78] Bashkatov AN, Genina EA, Kochubey VI, Tuchin VV. Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000 nm. *Journal of Physics D: Applied Physics.* 2005;38:2543.
- [79] Pansare VJ, Hejazi S, Faenza WJ, Prud'homme RK. Review of Long-Wavelength Optical and NIR Imaging Materials: Contrast Agents, Fluorophores, and Multifunctional Nano Carriers. *Chemistry of Materials.* 2012;24:812-27.
- [80] Frangioni JV. In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Current opinion in chemical biology.* 2003;7:626-34.
- [81] Appaix F, Monnereau C, Van Der Sander B. Visualisation 3D de la vascularisation cérébrale par microscopie à deux photons. *Techniques de l'ingénieur Imagerie médicale, électronique et TIC pour la santé.* 2014;base documentaire : TIB607DUO.
- [82] He X, Gao J, Gambhir SS, Cheng Z. Near-infrared fluorescent nanoprobes for cancer molecular imaging: status and challenges. *Trends in Molecular Medicine.* 2010;16:574-83.
- [83] Achilefu S. The Insatiable Quest for Near Infrared Fluorescent Probes for Molecular Imaging. *Angewandte Chemie (International ed in English).* 2010;49:9816-8.
- [84] Qian G, Wang ZY. Near-Infrared Organic Compounds and Emerging Applications. *Chemistry – An Asian Journal.* 2010;5:1006-29.
- [85] Bricks JL, Kachkovskii AD, Slominskii YL, Gerasov AO, Popov SV. Molecular design of near infrared polymethine dyes: A review. *Dyes and Pigments.* 2015;121:238-55.
- [86] Chen X, Pradhan T, Wang F, Kim JS, Yoon J. Fluorescent Chemosensors Based on Spiroring-Opening of Xanthenes and Related Derivatives. *Chemical Reviews.* 2012;112:1910-56.
- [87] Desmettre T, Devoisselle J, Mordon S. Fluorescence properties and metabolic features of indocyanine green (ICG) as related to angiography. *Survey of ophthalmology.* 2000;45:15-27.
- [88] Raabe A, Beck J, Gerlach R, Zimmermann M, Seifert V. Near-infrared indocyanine green video angiography: a new method for intraoperative assessment of vascular flow. *Neurosurgery.* 2003;52:132-9.
- [89] Pascal S, Haefele A, Monnereau C, Charaf-Eddin A, Jacquemin D, Le Guennic B, et al. Expanding the Polymethine Paradigm: Evidence for the Contribution of a Bis-Dipolar Electronic Structure. *The Journal of Physical Chemistry A.* 2014;118:4038-47.
- [90] Seo S, Pascal S, Park C, Shin K, Yang X, Maury O, et al. NIR electrochemical fluorescence switching from polymethine dyes. *Chemical Science.* 2014;5:1538-44.

- [91] He L, Lin W, Xu Q, Wei H. A Unique Type of Pyrrole-Based Cyanine Fluorophores with Turn-on and Ratiometric Fluorescence Signals at Different pH Regions for Sensing pH in Enzymes and Living Cells. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2014;6:22326-33.
- [92] Hilderbrand SA, Kelly KA, Weissleder R, Tung C-H. Monofunctional Near-Infrared Fluorochromes for Imaging Applications. *Bioconjugate Chemistry*. 2005;16:1275-81.
- [93] Hilderbrand SA, Shao F, Salthouse C, Mahmood U, Weissleder R. Upconverting luminescent nanomaterials: application to in vivo bioimaging. *Chemical Communications*. 2009:4188-90.
- [94] Killoran J, O'Shea DF. Impact of a conformationally restricted receptor on the BF₂ chelated azadipyrromethene fluorosensing platform. *Chemical Communications*. 2006:1503-5.
- [95] Umezawa K, Nakamura Y, Makino H, Citterio D, Suzuki K. Bright, Color-Tunable Fluorescent Dyes in the Visible–Near-Infrared Region. *Journal of the American Chemical Society*. 2008;130:1550-1.
- [96] Jiang X-D, Gao R, Yue Y, Sun G-T, Zhao W. A NIR BODIPY dye bearing 3,4,4a-trihydroxanthene moieties. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2012;10:6861-5.
- [97] Gawley RE, Mao H, Haque MM, Thorne JB, Pharr JS. Visible Fluorescence Chemosensor for Saxitoxin. *The Journal of Organic Chemistry*. 2007;72:2187-91.
- [98] Coskun A, Yilmaz MD, Akkaya EU. Bis(2-pyridyl)-Substituted Boratriazaindacene as an NIR-Emitting Chemosensor for Hg(II). *Organic Letters*. 2007;9:607-9.
- [99] Hall MJ, Allen LT, O'Shea DF. PET modulated fluorescent sensing from the BF₂ chelated azadipyrromethene platform. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2006;4:776-80.
- [100] Sozmen F, Kolemen S, Kumada H-O, Ono M, Saji H, Akkaya EU. Designing BODIPY-based probes for fluorescence imaging of [small beta]-amyloid plaques. *RSC Advances*. 2014;4:51032-7.
- [101] Salim MM, Owens EA, Gao T, Lee JH, Hyun H, Choi HS, et al. Hydroxylated near-infrared BODIPY fluorophores as intracellular pH sensors. *Analyst*. 2014;139:4862-73.
- [102] Anthony DA, Abdellah F, Frédéric F. Boron difluoride complexes of 2'-hydroxychalcones and curcuminoids as fluorescent dyes for photonic applications. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. 2015;6:015009.
- [103] Motoike T, Loughna S, Perens E, Roman BL, Liao W, Chau TC, et al. Universal GFP reporter for the study of vascular development. *Genesis*. 2000;28:75-81.
- [104] Müller-Taubenberger A, Vos MJ, Böttger A, Lasi M, Lai FPL, Fischer M, et al. Monomeric red fluorescent protein variants used for imaging studies in different species. *European Journal of Cell Biology*. 2006;85:1119-29.
- [105] Zimmer M. GFP: from jellyfish to the Nobel prize and beyond. *Chemical Society Reviews*. 2009;38:2823-32.
- [106] Zrazhevskiy P, Sena M, Gao X. Designing multifunctional quantum dots for bioimaging, detection, and drug delivery. *Chemical Society Reviews*. 2010;39:4326-54.
- [107] Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. 2005;26:3995-4021.
- [108] Gao X, Cui Y, Levenson RM, Chung LW, Nie S. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nature biotechnology*. 2004;22:969-76.
- [109] Park J, Dvoracek C, Lee KH, Galloway JF, Bhang H-eC, Pomper MG, et al. CuInSe/ZnS Core/Shell NIR Quantum Dots for Biomedical Imaging. *Small*. 2011;7:3148-52.
- [110] Zimmer JP, Kim S-W, Ohnishi S, Tanaka E, Frangioni JV, Bawendi MG. Size Series of Small Indium Arsenide–Zinc Selenide Core–Shell Nanocrystals and Their Application to In Vivo Imaging. *Journal of the American Chemical Society*. 2006;128:2526-7.

- [111] Kim S, Lim YT, Soltesz EG, De Grand AM, Lee J, Nakayama A, et al. Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat Biotech.* 2004;22:93-7.
- [112] Haase M, Schäfer H. Upconverting Nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition.* 2011;50:5808-29.
- [113] Budijono SJ, Shan J, Yao N, Miura Y, Hoyer T, Austin RH, et al. Synthesis of stable block-copolymer-protected NaYF₄: Yb³⁺, Er³⁺ up-converting phosphor nanoparticles. *Chemistry of Materials.* 2009;22:311-8.
- [114] Heilemann M. Fluorescence microscopy beyond the diffraction limit. *Journal of Biotechnology.* 2010;149:243-51.
- [115] Leung BO, Chou KC. Review of Super-Resolution Fluorescence Microscopy for Biology. *Applied Spectroscopy.* 2011;65:967-80.
- [116] Han R, Li Z, Fan Y, Jiang Y. Recent Advances in Super-Resolution Fluorescence Imaging and Its Applications in Biology. *Journal of Genetics and Genomics.* 2013;40:583-95.
- [117] Ruckebusch C, Bernex R, Allegrini F, Sliwa M, Hofkens J, Dedecker P. Mapping Pixel Dissimilarity in Wide-Field Super-Resolution Fluorescence Microscopy. *Analytical Chemistry.* 2015;87:4675-82.
- [118] Bates M, Huang B, Dempsey GT, Zhuang X. Multicolor Super-Resolution Imaging with Photo-Switchable Fluorescent Probes. *Science.* 2007;317:1749-53.
- [119] Celli JP, Spring BQ, Rizvi I, Evans CL, Samkoe KS, Verma S, et al. Imaging and Photodynamic Therapy: Mechanisms, Monitoring, and Optimization. *Chemical Reviews.* 2010;110:2795-838.
- [120] Hönigsmann H. History of phototherapy in dermatology. *Photochemical & photobiological sciences.* 2013;12:16-21.
- [121] Potterat O, Hamburger M. Drug discovery and development with plant-derived compounds. In: Petersen F, Amstutz R, editors. *Natural Compounds as Drugs Volume I: Birkhäuser Basel;* 2008. p. 45-118.
- [122] Pathak MA, Fitzpatrick TB. The evolution of photochemotherapy with psoralens and UVA (PUVA): 2000 BC to 1992 AD. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 1992;14:3-22.
- [123] Rai R, Srinivas C. Phototherapy: An Indian perspective 2007.
- [124] Choudhary S, Nouri K, Elsaie M. Photodynamic therapy in dermatology: a review. *Lasers Med Sci.* 2009;24:971-80.
- [125] Ortonne J-P. Psoralen therapy in vitiligo. *Clinics in Dermatology.* 1989;7:120-35.
- [126] Parsons BJ. Psoralen photochemistry. *Photochemistry and Photobiology.* 1980;32:813-21.
- [127] Roelandts R. A new light on Niels Finsen, a century after his nobel prize. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine.* 2005;21:115-7.
- [128] v. Tappeiner H. Ueber die Wirkung fluorescirender Substanzen auf Fermente und Toxine. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft.* 1903;36:3035-8.
- [129] Pizova K, Tomankova K, Daskova A, Binder S, Bajgar R, Kolarova H. Photodynamic therapy for enhancing antitumour immunity. *Biomedical papers.* 2012;156:93-102.
- [130] Ormond A, Freeman H. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Materials.* 2013;6:817-40.
- [131] Bethea D, Fullmer B, Syed S, Seltzer G, Tiano J, Rischko C, et al. Psoralen photobiology and photochemotherapy: 50 years of science and medicine. *Journal of dermatological science.* 1999;19:78-88.
- [132] DeRosa MC, Crutchley RJ. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews.* 2002;233:351-71.

- [133] Sastri C, Eswaramoorthy D, Giribabu L, Maiya BG. DNA interactions of new mixed-ligand complexes of cobalt (III) and nickel (II) that incorporate modified phenanthroline ligands. *Journal of inorganic biochemistry*. 2003;94:138-45.
- [134] Clarke MJ. Ruthenium metallopharmaceuticals. *Coordination Chemistry Reviews*. 2002;232:69-93.
- [135] Allison R, Mota H, Sibata C. Clinical PD/PDT in North America: an historical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2004;1:263-77.
- [136] Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*. 2001;74:656-69.
- [137] Lewis GN. The Magnetochemical Theory. *Chemical Reviews*. 1924;1:231-48.
- [138] Mulliken RS. Interpretation of the atmospheric oxygen bands; electronic levels of the oxygen molecule. *Nature*. 1928;122:505.
- [139] Kautsky H, De Bruijn H. Die Aufklärung der Photolumineszenztilgung fluoreszierender Systeme durch Sauerstoff: Die Bildung aktiver, diffusionsfähiger Sauerstoffmoleküle durch Sensibilisierung. *Naturwissenschaften*. 1931;19:1043-.
- [140] Gaffron H. Über den Mechanismus der Sauerstoff-Aktivierung durch belichtete Farbstoffe, II. Mitteil.: Photoxydation im nahen Infrarot. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*. 1935;68:1409-11.
- [141] Kasha M, Khan AU. The physics, chemistry and biology of singlet molecular oxygen. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1970;171:5-23.
- [142] Khan AU, Kasha M. Red Chemiluminescence of Molecular Oxygen in Aqueous Solution. *The Journal of Chemical Physics*. 1963;39:2105-6.
- [143] Khan A, Kasha M. Rotational structure in the chemiluminescence spectrum of molecular oxygen in aqueous systems. 1964.
- [144] Khan A, Kasha M. Physical Theory of Chemiluminescence in Systems Evolving Molecular Oxygen. *Journal of the American Chemical Society*. 1966;88:1574-6.
- [145] Greer A. Christopher Foote's discovery of the role of singlet oxygen [1O_2 ($^1\Delta_g$)] in photosensitized oxidation reactions. *Accounts of chemical research*. 2006;39:797-804.
- [146] Foote CS. Mechanisms of photosensitized oxidation. *Science*. 1968;162:963-70.
- [147] Foote CS. Photosensitized oxygenations and the role of singlet oxygen. *Accounts of Chemical Research*. 1968;1:104-10.
- [148] Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korblik M, et al. Photodynamic Therapy. *Journal of the National Cancer Institute*. 1998;90:889-905.
- [149] Collins HA, Khurana M, Moriyama EH, Mariampillai A, Dahlstedt E, Balaz M, et al. Blood-vessel closure using photosensitizers engineered for two-photon excitation. *Nature Photonics*. 2008;2:420-4.
- [150] Korblik M. Induction of tumor immunity by photodynamic therapy. *Journal of clinical laser medicine & surgery*. 1996;14:329-34.
- [151] Wilkinson F, Helman W P, Ross A B. Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. 1993;22:113-262.
- [152] Schweitzer C, Schmidt R. Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen. *Chemical reviews*. 2003;103:1685-758.
- [153] Takemura T, Ohta N, Nakajima S, Sakata I. Critical importance of the triplet lifetime of photosensitizer in photodynamic therapy of tumor. *Photochemistry and photobiology*. 1989;50:339-44.
- [154] Wilson DF, Cerniglia GJ. Localization of tumors and evaluation of their state of oxygenation by phosphorescence imaging. *Cancer research*. 1992;52:3988-93.

- [155] Wilkinson F, Helman WP, Ross AB. Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. *Journal of physical and chemical reference data*. 1993;22:113-262.
- [156] Lower SK, El-Sayed MA. The Triplet State and Molecular Electronic Processes in Organic Molecules. *Chemical Reviews*. 1966;66:199-241.
- [157] Tang C, Hu P, Ma E, Huang M, Zheng Q. Heavy atom enhanced generation of singlet oxygen in novel indenofluorene-based two-photon absorbing chromophores for photodynamic therapy. *Dyes and Pigments*. 2015;117:7-15.
- [158] Duman S, Cakmak Y, Kolenen S, Akkaya EU, Dede Y. Heavy atom free singlet oxygen generation: doubly substituted configurations dominate S1 states of bis-BODIPYs. *The Journal of organic chemistry*. 2012;77:4516-27.
- [159] Lanoë P-H, Gallavardin T, Dupin A, Maury O, Baldeck PL, Lindgren M, et al. Influence of bromine substitution pattern on the singlet oxygen generation efficiency of two-photon absorbing chromophores. *Organic & biomolecular chemistry*. 2012;10:6275-8.
- [160] Ohulchanskyy TY, Donnelly DJ, Detty MR, Prasad PN. Heteroatom substitution induced changes in excited-state photophysics and singlet oxygen generation in chalcogenoxanthylum dyes: Effect of sulfur and selenium substitutions. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2004;108:8668-72.
- [161] Sauerwein B, Schuster GB. External iodine atoms influence over the intersystem crossing rate of cyanine iodide ion pair in benzene solution. *The Journal of Physical Chemistry*. 1991;95:1903-6.
- [162] El-Sayed M. Comments on Contaminating the Ground State with Triplet Character. *The Journal of Chemical Physics*. 1963;38:3032-3.
- [163] El-Sayed M. Spin—Orbit Coupling and the Radiationless Processes in Nitrogen Heterocyclics. *The Journal of Chemical Physics*. 1963;38:2834-8.
- [164] Reindl S, Penzkofer A. Triplet quantum yield determination by picosecond laser double-pulse fluorescence excitation. *Chemical Physics*. 1996;213:429-38.
- [165] Bachilo SM, Weisman RB. Determination of Triplet Quantum Yields from Triplet–Triplet Annihilation Fluorescence. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2000;104:7711-4.
- [166] Lament B, Karpiuk J, Waluk J. Determination of triplet formation efficiency from kinetic profiles of the ground state recovery. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2003;2:267-72.
- [167] Schmidt R. Photosensitized generation of singlet oxygen. *Photochemistry and photobiology*. 2006;82:1161-77.
- [168] Schmidt R. Quantitative Determination of $1\Sigma_g^+$ and $1\Delta_g$ Singlet Oxygen in Solvents of Very Different Polarity. General Energy Gap Law for Rate Constants of Electronic Energy Transfer to and from O₂ in the Absence of Charge Transfer Interactions. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2006;110:2622-8.
- [169] Hild M, Schmidt R. The Mechanism of the Collision-Induced Enhancement of the $a\ 1\ \Delta_g \rightarrow X3\Sigma_g^-$ and $b1\Sigma_g^+ \rightarrow a1\Delta_g$ Radiative Transitions of O₂. *The Journal of Physical Chemistry A*. 1999;103:6091-6.
- [170] Moan J. On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1990;6:343-4.
- [171] Allison RR. Photodynamic therapy: oncologic horizons. *Future Oncology*. 2013;10:123-4.
- [172] Dhaneshwar S, Patil K, Bulbule M, Kinjawadekar V, Joshi D, Joshi V. Photodynamic Therapy for Cancer. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review Research*. 2014;27:125-41.

- [173] Dai T, Fuchs BB, Coleman JJ, Prates RA, Astrakas C, St. Denis TG, et al. Concepts and Principles of Photodynamic Therapy as an Alternative Antifungal Discovery Platform. *Frontiers in Microbiology*. 2012;3:120.
- [174] Brancalion L, Moseley H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers in Medical Science*. 2002;17:173-86.
- [175] Morton CA, Whitehurst C, Moseley H, McColl J, Moore JV, Mackie R. Comparison of photodynamic therapy with cryotherapy in the treatment of Bowen's disease. *British Journal of Dermatology*. 1996;135:766-71.
- [176] Kinsella TJ, Colussi VC, Oleinick NL, Sibata CH. Photodynamic therapy in oncology. Expert opinion on pharmacotherapy. 2001;2:917-27.
- [177] Brown SB, Brown EA, Walker I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *The lancet oncology*. 2004;5:497-508.
- [178] Vincent P, Maskos U, Charvet I, Bourgeais L, Stoppini L, Leresche N, et al. Live imaging of neural structure and function by fibred fluorescence microscopy. *EMBO reports*. 2006;7:1154-61.
- [179] Harrod-Kim P. Tumor Ablation with Photodynamic Therapy: Introduction to Mechanism and Clinical Applications. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*. 2006;17:1441-8.
- [180] Spikes JD. Photodynamic Action: From Paramesium to Photochemotherapy*. *Photochemistry and Photobiology*. 1997;65:142S-7S.
- [181] Detty MR, Gibson SL, Wagner SJ. Current Clinical and Preclinical Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2004;47:3897-915.
- [182] Boyle RW, Dolphin D. Structure and Biodistribution Relationships of Photodynamic Sensitizers*. *Photochemistry and photobiology*. 1996;64:469-85.
- [183] Sternberg ED, Dolphin D, Brückner C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron*. 1998;54:4151-202.
- [184] Juzeniene A, Juzenas P, Ma L-W, Iani V, Moan J. Effectiveness of different light sources for 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*. 2004;19:139-49.
- [185] Li G, Graham A, Chen Y, Dobhal MP, Morgan J, Zheng G, et al. Synthesis, comparative photosensitizing efficacy, human serum albumin (site II) binding ability, and intracellular localization characteristics of novel benzobacteriochlorins derived from vic-dihydroxybacteriochlorins. *Journal of medicinal chemistry*. 2003;46:5349-59.
- [186] Antoni PM, Naik A, Albert I, Rubbiani R, Gupta S, Ruiz-Sanchez P, et al. (Metallo)porphyrins as Potent Phototoxic Anti-Cancer Agents after Irradiation with Red Light. *Chemistry – A European Journal*. 2015;21:1179-83.
- [187] Margaron P, Grégoire MJ, Șcăsnăr V, Ali H, Lier JE. Structure-Photodynamic Activity Relationships of a Series of 4-Substituted Zinc Phthalocyanines. *Photochemistry and photobiology*. 1996;63:217-23.
- [188] Berg K, Bommer JC, Moan J. Evaluation of sulfonated aluminum phthalocyanines for use in photochemotherapy. A study on the relative efficiencies of photoinactivation. *Photochemistry and photobiology*. 1989;49:587-94.
- [189] Colussi VC, Feyes DK, Mulvihill JW, Li YS, Kenney ME, Elmets CA, et al. Phthalocyanine 4 (Pc 4) Photodynamic Therapy of Human OVCAR-3 Tumor Xenografts. *Photochemistry and photobiology*. 1999;69:236-41.
- [190] Boyle R, Paquette B, Van Lier J. Biological activities of phthalocyanines. XIV. Effect of hydrophobic phthalimidomethyl groups on the in vivo phototoxicity and mechanism of photodynamic action of sulphonated aluminium phthalocyanines. *British journal of cancer*. 1992;65:813.

- [191] Ogura S-i, Tabata K, Fukushima K, Kamachi T, Okura I. Development of phthalocyanines for photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. 2006;10:1116-24.
- [192] Trushina OI, Novikova EG, Sokolov VV, Filonenko EV, Chissov VI, Vorozhtsov GN. Photodynamic therapy of virus-associated precancer and early stages cancer of cervix uteri. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2008;5:256-9.
- [193] Scholz M, Dedic R, Breitenbach T, Hala J. Singlet oxygen-sensitized delayed fluorescence of common water-soluble photosensitizers. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2013;12:1873-84.
- [194] Brennan NK, Hall JP, Davies SR, Gollnick SO, Oseroff AR, Gibson SL, et al. In vitro photodynamic properties of chalcogenopyrylium analogues of the thiopyrylium antitumor agent AA1. *Journal of medicinal chemistry*. 2002;45:5123-35.
- [195] Santos PF, Reis LV, Almeida P, Oliveira AS, Vieira Ferreira LF. Singlet oxygen generation ability of squarylium cyanine dyes. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2003;160:159-61.
- [196] Kamkaew A, Lim SH, Lee HB, Kiew LV, Chung LY, Burgess K. BODIPY dyes in photodynamic therapy. *Chemical Society Reviews*. 2013;42:77-88.
- [197] Adarsh N, Avirah RR, Ramaiah D. Tuning Photosensitized Singlet Oxygen Generation Efficiency of Novel Aza-BODIPY Dyes. *Organic Letters*. 2010;12:5720-3.
- [198] Belfield K, Corredor C, Morales A, Dessources M, Hernandez F. Synthesis and Characterization of New Fluorene-Based Singlet Oxygen Sensitizers. *Journal of Fluorescence*. 2006;16:105-10.
- [199] Delaey E, van Laar F, De Vos D, Kamuhabwa A, Jacobs P, de Witte P. A comparative study of the photosensitizing characteristics of some cyanine dyes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2000;55:27-36.
- [200] Hoebeke M, Seret A, Piette J, Van de Vorst A. Singlet oxygen production and photoisomerization: Two competitive processes for merocyanine 540 irradiated with visible light. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1988;1:437-46.
- [201] Hudson R, Boyle RW. Strategies for selective delivery of photodynamic sensitizers to biological targets. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. 2004;8:954-75.
- [202] Fisher W, Partridge W, Dees C, Wachter E. Simultaneous Two-Photon Activation of Type-I Photodynamic Therapy Agents. *Photochemistry and photobiology*. 1997;66:141-55.
- [203] Karotki A, Khurana M, Lepock JR, Wilson BC. Simultaneous Two-photon Excitation of Photofrin in Relation to Photodynamic Therapy. *Photochemistry and photobiology*. 2006;82:443-52.
- [204] Khurana M, Collins HA, Karotki A, Anderson HL, Cramb DT, Wilson BC. Quantitative In Vitro Demonstration of Two-Photon Photodynamic Therapy Using Photofrin® and Visudyne®. *Photochemistry and photobiology*. 2007;83:1441-8.
- [205] Atif M, Dyer P, Paget TA, Snelling H, Stringer M. Two-photon excitation studies of m-THPC photosensitizer and photodynamic activity in an epithelial cell line. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. 2007;4:106-11.
- [206] Hamed B, von Haimberger T, Kozich V, Wiehe A, Heyne K. Two-photon cross-sections of the photosensitizers m-THPC and m-THPP in the 1.05–1.45 μm range. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2014;295:53-6.
- [207] Kim S, Ohulchanskyy TY, Pudavar HE, Pandey RK, Prasad PN. Organically modified silica nanoparticles co-encapsulating photosensitizing drug and aggregation-enhanced two-photon absorbing fluorescent dye aggregates for two-photon photodynamic therapy. *Journal of the American Chemical Society*. 2007;129:2669-75.

- [208] Ngen EJ, Xiao L, Rajaputra P, Yan X, You Y. Enhanced Singlet Oxygen Generation from a Porphyrin–Rhodamine B Dyad by Two-Photon Excitation through Resonance Energy Transfer. *Photochemistry and photobiology*. 2013;89:841-8.
- [209] Dichtel WR, Serin JM, Edder C, Fréchet JM, Matuszewski M, Tan L-S, et al. Singlet oxygen generation via two-photon excited FRET. *Journal of the American Chemical Society*. 2004;126:5380-1.
- [210] Schmitt J, Heitz V, Sour A, Bolze F, Ftouni H, Nicoud JF, et al. Diketopyrrolopyrrole-Porphyrin Conjugates with High Two-Photon Absorption and Singlet Oxygen Generation for Two-Photon Photodynamic Therapy. *Angewandte Chemie International Edition*. 2015;54:169-73.
- [211] Dahlstedt E, Collins HA, Balaz M, Kuimova MK, Khurana M, Wilson BC, et al. One-and two-photon activated phototoxicity of conjugated porphyrin dimers with high two-photon absorption cross sections. *Organic & biomolecular chemistry*. 2009;7:897-904.
- [212] Ogawa K, Hasegawa H, Inaba Y, Kobuke Y, Inouye H, Kanemitsu Y, et al. Water-soluble bis (imidazolylporphyrin) self-assemblies with large two-photon absorption cross sections as potential agents for photodynamic therapy. *Journal of medicinal chemistry*. 2006;49:2276-83.
- [213] Ogawa K, Ohashi A, Kobuke Y, Kamada K, Ohta K. Strong two-photon absorption of self-assembled butadiyne-linked bisporphyrin. *Journal of the American Chemical Society*. 2003;125:13356-7.
- [214] Mongin O, Hugues V, Blanchard-Desce M, Merhi A, Drouet S, Yao D, et al. Fluorenyl porphyrins for combined two-photon excited fluorescence and photosensitization. *Chemical Physics Letters*. 2015;625:151-6.
- [215] Arnbjerg J, Jiménez-Banzo A, Paterson MJ, Nonell S, Borrell JI, Christiansen O, et al. Two-photon absorption in tetraphenylporphycenes: are porphycenes better candidates than porphyrins for providing optimal optical properties for two-photon photodynamic therapy? *Journal of the American Chemical Society*. 2007;129:5188-99.
- [216] Beverina L, Crippa M, Landenna M, Ruffo R, Salice P, Silvestri F, et al. Assessment of Water-Soluble π -Extended Squaraines as One- and Two-Photon Singlet Oxygen Photosensitizers: Design, Synthesis, and Characterization. *Journal of the American Chemical Society*. 2008;130:1894-902.
- [217] Webster S, Peceli D, Hu H, Padilha LA, Przhonska OV, Masunov AE, et al. Near-Unity Quantum Yields for Intersystem Crossing and Singlet Oxygen Generation in Polymethine-like Molecules: Design and Experimental Realization. *The Journal of Physical Chemistry Letters*. 2010;1:2354-60.
- [218] Nielsen CB, Arnbjerg J, Johnsen M, Jørgensen M, Ogilby PR. Molecular tuning of phenylene-vinylene derivatives for two-photon photosensitized singlet oxygen production. *The Journal of organic chemistry*. 2009;74:9094-104.
- [219] McIlroy SP, Cló E, Nikolajsen L, Frederiksen PK, Nielsen CB, Mikkelsen KV, et al. Two-photon photosensitized production of singlet oxygen: Sensitizers with phenylene-ethynylene-based chromophores. *The Journal of organic chemistry*. 2005;70:1134-46.
- [220] Sonogashira K, Tohda Y, Hagihara N. A convenient synthesis of acetylenes: catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes and bromopyridines. *Tetrahedron Letters*. 1975;16:4467-70.
- [221] Johansson Seechurn CC, Kitching MO, Colacot TJ, Snieckus V. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling: A Historical Contextual Perspective to the 2010 Nobel Prize. *Angewandte Chemie International Edition*. 2012;51:5062-85.

- [222] Cepraga C, Gallavardin T, Marotte S, Lanoë P-H, Mulatier J-C, Lerouge F, et al. Biocompatible well-defined chromophore–polymer conjugates for photodynamic therapy and two-photon imaging. *Polymer Chemistry*. 2013;4:61-7.
- [223] Navarro JR, Lerouge F, Cepraga C, Micouin G, Favier A, Chateau D, et al. Nanocarriers with ultrahigh chromophore loading for fluorescence bio-imaging and photodynamic therapy. *Biomaterials*. 2013;34:8344-51.
- [224] Monnereau C, Marotte S, Lanoë P-H, Maury O, Baldeck PL, Kreher D, et al. Water-soluble chromophores with star-shaped oligomeric arms: synthesis, spectroscopic studies and first results in bio-imaging and cell death induction. *New Journal of Chemistry*. 2012;36:2328-33.
- [225] Gallavardin T. Chromophores à absorption multiphotonique pour l'imagerie et la photothérapie dynamique : synthèse, vectorisation, greffage sur nanoparticules d'or et propriétés spectroscopiques. 2010:p269.
- [226] Tougeri A, Negri S, Jutand A. Mechanism of the Copper-Free Palladium-Catalyzed Sonagashira Reactions: Multiple Role of Amines. *Chemistry-A European Journal*. 2007;13:666-76.
- [227] Li K, Wang Q. Multiple self-assembled nanostructures from an oligo (p-phenyleneethynylene) containing rod–coil–rod triblock copolymer. *Chem Commun*. 2005:4786-8.
- [228] Shi W, Lei A. 1, 3-Diyne chemistry: synthesis and derivations. *Tetrahedron Letters*. 2014;55:2763-72.
- [229] Camps P, Gómez T. Synthesis and reactions of a new 1, 1-disubstituted cyclopentadiene. *ARKIVOC*. 2011;3:128-39.
- [230] Lu J, Ho DM, Vogelaar NJ, Kraml CM, Pascal RA. A pentacene with a 144 twist. *Journal of the American Chemical Society*. 2004;126:11168-9.
- [231] Lu J, Ho DM, Vogelaar NJ, Kraml CM, Bernhard S, Byrne N, et al. Synthesis, structure, and resolution of exceptionally twisted pentacenes. *Journal of the American Chemical Society*. 2006;128:17043-50.
- [232] Schöberl U, Magnera TF, Harrison RM, Fleischer F, Pflug JL, Schwab PF, et al. Toward a Hexagonal Grid Polymer: Synthesis, Coupling, and Chemically Reversible Surface-Pinning of the Star Connectors, 1, 3, 5-C₆H₃ (CB10H10CX) 3. *Journal of the American Chemical Society*. 1997;119:3907-17.
- [233] Lee SL, Lin HA, Lin YH, Chen HH, Liao CT, Lin TL, et al. Gearing of Molecular Swirls: Columnar Packing of Nematogenic Hexakis (4-alkoxyphenylethynyl) benzene Derivatives. *Chemistry-A European Journal*. 2011;17:792-9.
- [234] Kobayashi K, Kobayashi N. Synthesis and self-association, absorption, and fluorescence properties of differentially functionalized hexakis (p-substituted-phenylethynyl) benzenes. *The Journal of organic chemistry*. 2004;69:2487-97.
- [235] Thomas SW, Swager TM. Synthesis and optical properties of simple amine-containing conjugated polymers. *Macromolecules*. 2005;38:2716-21.
- [236] Monnereau C, Blart E, Odobel F. A cheap and efficient method for selective para-iodination of aniline derivatives. *Tetrahedron letters*. 2005;46:5421-3.
- [237] Shen H, Vollhardt KP. Remarkable Switch in the Regiochemistry of the Iodination of Anilines by N-Iodosuccinimide: Synthesis of 1, 2-Dichloro-3, 4-diiodobenzene. *Synlett*. 2012;2012:208-14.
- [238] Kubo Y, Ikeda M, Sugasaki A, Takeuchi M, Shinkai S. A porphyrin tetramer for a positive homotropic allosteric recognition system: efficient binding information transduction through butadiynyl axis rotation. *Tetrahedron Letters*. 2001;42:7435-8.

- [239] Vital P, Tanner D. Efficient and highly enantioselective formation of the all-carbon quaternary stereocentre of lyngbyatoxin A. *Organic & biomolecular chemistry*. 2006;4:4292-8.
- [240] Diemer V, Leroux FR, Colobert F. Efficient and Complementary Methods Offering Access to Synthetically Valuable 1, 2-Dibromobenzenes. *European Journal of Organic Chemistry*. 2011;2011:327-40.
- [241] Herrbach A, Marinetti A, Baudoin O, Guénard D, Guéritte F. Asymmetric synthesis of an axially chiral antimitotic biaryl via an atropo-enantioselective Suzuki cross-coupling. *The Journal of organic chemistry*. 2003;68:4897-905.
- [242] Wang L, Lu W. Preparation of unsymmetrical biaryls by Pd (II)-catalyzed cross-coupling of aryl iodides. *Organic letters*. 2009;11:1079-82.
- [243] Ishiyama T, Ishida K, Miyaura N. Synthesis of pinacol arylboronates via cross-coupling reaction of bis (pinacolato) diboron with chloroarenes catalyzed by palladium (0)-tricyclohexylphosphine complexes. *Tetrahedron*. 2001;57:9813-6.
- [244] Kulhánek J, Bureš F, Ludwig M. Convenient methods for preparing π -conjugated linkers as building blocks for modular chemistry. *Beilstein journal of organic chemistry*. 2009;5:11.
- [245] Iwashita M, Fujii S, Ito S, Hirano T, Kagechika H. Efficient and diversity-oriented total synthesis of Riccardin C and application to develop novel macrolactam derivatives. *Tetrahedron*. 2011;67:6073-82.
- [246] Sluch MI, Godt A, Bunz UHF, Berg MA. Excited-State Dynamics of Oligo(p-phenyleneethynylene): Quadratic Coupling and Torsional Motions. *Journal of the American Chemical Society*. 2001;123:6447-8.
- [247] Denk W, Strickler J, Webb W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*. 1990;248:73-6.
- [248] Shih AY, Driscoll JD, Drew PJ, Nishimura N, Schaffer CB, Kleinfeld D. Two-photon microscopy as a tool to study blood flow and neurovascular coupling in the rodent brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2012;32:1277-309.
- [249] Kim S-G. Perfusion MR imaging: Evolution from initial development to functional studies. *NeuroImage*. 2012;62:672-5.
- [250] Kleinfeld D, Mitra PP, Helmchen F, Denk W. Fluctuations and stimulus-induced changes in blood flow observed in individual capillaries in layers 2 through 4 of rat neocortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95:15741-6.
- [251] van der Sanden BP, Rozijn TH, Rijken PF, Peters HP, Heerschap A, van der Kogel AJ, et al. Noninvasive assessment of the functional neovasculature in 9L-glioma growing in rat brain by dynamic 1H magnetic resonance imaging of gadolinium uptake. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2000;20:861-70.
- [252] Perles-Barbacaru AT, van der Sanden BP, Farion R, Lahrech H. How stereological analysis of vascular morphology can quantify the blood volume fraction as a marker for tumor vasculature: comparison with magnetic resonance imaging. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2012;32:489-501.
- [253] Fayad ZA, Fuster V, Nikolaou K, Becker C. Computed tomography and magnetic resonance imaging for noninvasive coronary angiography and plaque imaging current and potential future concepts. *Circulation*. 2002;106:2026-34.
- [254] Kircher MF, Willmann JrK. Molecular body imaging: MR imaging, CT, and US. Part I. Principles. *Radiology*. 2012;263:633-43.
- [255] Caravan P, Ellison JJ, McMurry TJ, Lauffer RB. Gadolinium (III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics, and applications. *Chemical reviews*. 1999;99:2293-352.
- [256] Hu H. Multi-slice helical CT: Scan and reconstruction. *Medical Physics*. 1999;26:5-18.

- [257] Singh J, Daftary A. Iodinated contrast media and their adverse reactions. *Journal of Nuclear Medicine Technology*. 2008;36:69-74.
- [258] Becker S, Strieth S, Canis M, Preissler G, Eichhorn ME. Automated Assessment of Tumour Microvascular Architecture In Vivo. *Anticancer research*. 2010;30:2597-602.
- [259] Marques PE, Antunes MM, David BA, Pereira RV, Teixeira MM, Menezes GB. Imaging liver biology in vivo using conventional confocal microscopy. *Nat Protocols*. 2015;10:258-68.
- [260] Fu L, Gan X, Gu M. Characterization of gradient-index lens-fiber spacing toward applications in two-photon fluorescence endoscopy. *Applied optics*. 2005;44:7270-4.
- [261] Dhakal K, Gu L, Black B, Mohanty SK. Fiber-optic two-photon optogenetic stimulation. *Optical Letters*. 2013;38:1927-9.
- [262] Sarkisyan G, Cahalan SM, Gonzalez-Cabrera PJ, Leaf NB, Rosen H. Real-time differential labeling of blood, interstitium, and lymphatic and single-field analysis of vasculature dynamics in vivo. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2012;302:C1460-C8.
- [263] Bogdanov AA, Weissleder R, Brady TJ. Long-circulating blood pool imaging agents. *Advanced drug delivery reviews*. 1995;16:335-48.
- [264] Albota MA, Xu C, Webb WW. Two-photon fluorescence excitation cross sections of biomolecular probes from 690 to 960 nm. *Applied optics*. 1998;37:7352-6.
- [265] Xu C, Webb WW. Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm. *Journal of the Optical Society of America B*. 1996;13:481-91.
- [266] Zipfel W. <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/references/molecular-probes-the-handbook/technical-notes-and-product-highlights/fluorescent-probes-for-two-photon-microscopy.html>. (consulté le 26/06/2015).
- [267] Abdul-Karim M-A, Al-Kofahi K, Brown EB, Jain RK, Roysam B. Automated tracing and change analysis of angiogenic vasculature from in vivo multiphoton confocal image time series. *Microvascular research*. 2003;66:113-25.
- [268] Smith AM, Duan H, Mohs AM, Nie S. Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008;60:1226-40.
- [269] Larson DR, Zipfel WR, Williams RM, Clark SW, Bruchez MP, Wise FW, et al. Water-Soluble Quantum Dots for Multiphoton Fluorescence Imaging in Vivo. *Science*. 2003;300:1434-6.
- [270] Cai W, Shin D-W, Chen K, Gheysens O, Cao Q, Wang SX, et al. Peptide-Labeled Near-Infrared Quantum Dots for Imaging Tumor Vasculature in Living Subjects. *Nano Letters*. 2006;6:669-76.
- [271] Arya H, Kaul Z, Wadhwa R, Taira K, Hirano T, Kaul SC. Quantum dots in bio-imaging: Revolution by the small. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;329:1173-7.
- [272] Derfus AM, Chan WCW, Bhatia SN. Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots. *Nano Letters*. 2003;4:11-8.
- [273] Ron H. A Toxicologic Review of Quantum Dots: Toxicity Depends on Physicochemical and Environmental Factors. *Environmental Health Perspectives*. 2006;114:165-72.
- [274] Ballou B, Lagerholm BC, Ernst LA, Bruchez MP, Waggoner AS. Noninvasive Imaging of Quantum Dots in Mice. *Bioconjugate Chemistry*. 2003;15:79-86.
- [275] Krishna TR, Parent M, Werts MH, Moreaux L, Gmouh S, Charpak S, et al. Water-Soluble Dendrimeric Two-Photon Tracers for In Vivo Imaging. *Angewandte Chemie International Edition*. 2006;45:4645-8.

- [276] Maurin M, Vurth L, Vial J-C, Baldeck P, Marder SR, Van der Sanden B, et al. Fluorescent Pluronic nanodots for in vivo two-photon imaging. *Nanotechnology*. 2009;20:235102.
- [277] Maurin M, Stéphan O, Vial J-C, Marder SR, Van Der Sanden B. Deep in vivo two-photon imaging of blood vessels with a new dye encapsulated in pluronic nanomicelles. *Journal of biomedical optics*. 2011;16:036001--6.
- [278] Zhang Y, Wada T, Sasabe H. A new hyperbranched polymer with polar chromophores for nonlinear optics. *Polymer*. 1997;38:2893-7.
- [279] Nesterov EE, Zhu Z, Swager TM. Conjugation enhancement of intramolecular exciton migration in poly (p-phenylene ethynylene) s. *Journal of the American Chemical Society*. 2005;127:10083-8.
- [280] Englman R, Jortner J. The energy gap law for radiationless transitions in large molecules. *Molecular Physics*. 1970;18:145-64.
- [281] Wang J-S, Matyjaszewski K. Controlled/" living" radical polymerization. Halogen atom transfer radical polymerization promoted by a Cu (I)/Cu (II) redox process. *Macromolecules*. 1995;28:7901-10.
- [282] Coca S, Jasieczek CB, Beers KL, Matyjaszewski K. Polymerization of acrylates by atom transfer radical polymerization. Homopolymerization of 2-hydroxyethyl acrylate. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 1998;36:1417-24.
- [283] Appukuttan VK, Dupont A, Denis-Quanquin S, Andraud C, Monnereau C. Mild and efficient bromination of poly (hydroxyethyl acrylate) and its use towards ionic-liquid containing polymers. *Polymer Chemistry*. 2012;3:2723-6.
- [284] Fukumura D, Duda DG, Munn LL, Jain RK. Tumor Microvasculature and Microenvironment: Novel Insights Through Intravital Imaging in Pre-Clinical Models. *Microcirculation*. 2010;17:206-25.
- [285] Kalchenko V, Madar-Balakirski N, Meglinski I, Harmelin A. In vivo characterization of tumor and tumor vascular network using multi-modal imaging approach. *Journal of biophotonics*. 2011;4:645-9.
- [286] Vajkoczy P, Schilling L, Ullrich A, Schmiedek P, Menger MD. Characterization of angiogenesis and microcirculation of high-grade glioma: an intravital multifluorescence microscopic approach in the athymic nude mouse. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 1998;18:510-20.
- [287] Toy R, Hayden E, Camann A, Berman Z, Vicente P, Tran E, et al. Multimodal in vivo imaging exposes the voyage of nanoparticles in tumor microcirculation. *ACS nano*. 2013;7:3118-29.
- [288] Smith BR, Zavaleta C, Rosenberg J, Tong R, Ramunas J, Liu Z, et al. High-resolution, serial intravital microscopic imaging of nanoparticle delivery and targeting in a small animal tumor model. *Nano today*. 2013;8:126-37.
- [289] Montet X, Figueiredo J-L, Alencar H, Ntziachristos V, Mahmood U, Weissleder R. Tomographic Fluorescence Imaging of Tumor Vascular Volume in Mice 1. *Radiology*. 2007;242:751-8.
- [290] Oostendorp M, Douma K, Hackeng TM, Dirksen A, Post MJ, van Zandvoort MA, et al. Quantitative molecular magnetic resonance imaging of tumor angiogenesis using cNGR-labeled paramagnetic quantum dots. *Cancer research*. 2008;68:7676-83.
- [291] Farrar CT, Kamoun WS, Ley CD, Kim YR, Kwon SJ, Dai G, et al. In vivo validation of MRI vessel caliber index measurement methods with intravital optical microscopy in a U87 mouse brain tumor model. *Neuro-oncology*. 2010:nop032.

- [292] Ricard C, Stanchi F, Rodriguez T, Amoureux M-C, Rougon G, Debarbieux F. Dynamic quantitative intravital imaging of glioblastoma progression reveals a lack of correlation between tumor growth and blood vessel density. *PloS one*. 2013;8:e72655.
- [293] Yang Y, Zhang Y, Hong H, Liu G, Leigh BR, Cai W. In vivo near-infrared fluorescence imaging of CD105 expression during tumor angiogenesis. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2011;38:2066-76.
- [294] Sarraf M, Perles-Barbacaru AT, Nissou MF, van der Sanden B, Berger F, Lahrech H. Rapid-Steady-State-T1 signal modeling during contrast agent extravasation: Toward tumor blood volume quantification without requiring the arterial input function. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2015;73:1005-14.
- [295] Perles-Barbacaru AT, Lahrech H. A new Magnetic Resonance Imaging method for mapping the cerebral blood volume fraction: the rapid steady-state T1 method. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006;27:618-31.
- [296] Bidard F-C, Mathiot C, Degeorges A, Etienne-Grimaldi M-C, Delva R, Pivot X, et al. Clinical value of circulating endothelial cells and circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients treated first line with bevacizumab and chemotherapy. *Annals of Oncology*. 2010.
- [297] Burger RA, Brady MF, Bookman MA, Fleming GF, Monk BJ, Huang H, et al. Incorporation of Bevacizumab in the Primary Treatment of Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2011;365:2473-83.
- [298] Ferrara N, Hillan KJ, Gerber H-P, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3:391-400.
- [299] Yao S, Belfield KD. Two-Photon Fluorescent Probes for Bioimaging. *European Journal of Organic Chemistry*. 2012;2012:3199-217.
- [300] Monnereau C, Andraud C. Recent Developments in Nonlinear Biophotonics: a Chemist Perspective. *Display and Imaging*. 2013;1:47-71.
- [301] Kim D, Ryu HG, Ahn KH. Recent development of two-photon fluorescent probes for bioimaging. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2014;12:4550-66.
- [302] Hayek A, Bolze F, Nicoud J-F, Baldeck PL, Mely Y. Synthesis and characterization of water-soluble two-photon excited blue fluorescent chromophores for bioimaging. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2006;5:102-6.
- [303] Barsu C, Cheaib R, Chambert S, Queneau Y, Maury O, Cottet D, et al. Neutral push-pull chromophores for nonlinear optical imaging of cell membranes. *Organic & biomolecular chemistry*. 2010;8:142-50.
- [304] Hayek A, Grichine A, Huault T, Ricard C, Bolze F, Van Der Sanden B, et al. Cell-permeant cytoplasmic blue fluorophores optimized for in vivo two-photon microscopy with low-power excitation. *Microscopy research and technique*. 2007;70:880-5.
- [305] Allain C, Schmidt F, Lartia R, Bordeau G, Fiorini-Debuisschert C, Charra F, et al. Vinyl-Pyridinium Triphenylamines: Novel Far-Red Emitters with High Photostability and Two-Photon Absorption Properties for Staining DNA. *ChemBioChem*. 2007;8:424-33.
- [306] Koo CK, So LKY, Wong KL, Ho YM, Lam YW, Lam MHW, et al. A Triphenylphosphonium-Functionalised Cyclometalated Platinum (II) Complex as a Nucleolus-Specific Two-Photon Molecular Dye. *Chemistry-A European Journal*. 2010;16:3942-50.
- [307] Lux J, Peña EJ, Bolze F, Heinlein M, Nicoud J-F. Malachite Green Derivatives for Two-Photon RNA Detection. *ChemBioChem*. 2012;13:1206-13.
- [308] Yang W, Chan PS, Chan MS, Li KF, Lo PK, Mak NK, et al. Two-photon fluorescence probes for imaging of mitochondria and lysosomes. *Chemical Communications*. 2013;49:3428-30.

- [309] Wang G, Pu K-Y, Zhang X, Li K, Wang L, Cai L, et al. Star-Shaped Glycosylated Conjugated Oligomer for Two-Photon Fluorescence Imaging of Live Cells. *Chemistry of Materials*. 2011;23:4428-34.
- [310] Vaillant O, Cheikh KE, Warther D, Brevet D, Maynadier M, Bouffard E, et al. Mannose-6-Phosphate Receptor: A Target for Theranostics of Prostate Cancer. *Angewandte Chemie International Edition*. 2015;54:5952-6.
- [311] Monnereau C, Andraud C, Maury O. Novel water-soluble chromophore. *PCT Int Appl*. 2013:WO 2013011242 A1 20130124.
- [312] Philippot C, Dubois F, Maurin M, Boury B, Prat A, Ibanez A. New core-shell hybrid nanoparticles for biophotonics: fluorescent organic nanocrystals confined in organosilicate spheres. *Journal of Materials Chemistry*. 2012;22:11370-8.
- [313] Prabhakar U, Maeda H, Jain RK, Sevick-Muraca EM, Zamboni W, Farokhzad OC, et al. Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology. *Cancer research*. 2013;73:2412-7.
- [314] Iyer AK, Khaled G, Fang J, Maeda H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug discovery today*. 2006;11:812-8.
- [315] Croissant JG, Qi C, Mongin O, Hugues V, Blanchard-Desce M, Raehm L, et al. Disulfide-gated mesoporous silica nanoparticles designed for two-photon-triggered drug release and imaging. *Journal of Materials Chemistry B*. 2015;3:6456-61.
- [316] Guardado-Alvarez TM, Devi LS, Vabre J-M, Pecorelli TA, Schwartz BJ, Durand J-O, et al. Photo-redox activated drug delivery systems operating under two photon excitation in the near-IR. *Nanoscale*. 2014;6:4652-8.
- [317] Croissant J, Maynadier M, Gallud A, Peindy N'Dongo H, Nyalosaso JL, Derrien G, et al. Two-Photon-Triggered Drug Delivery in Cancer Cells Using Nanoimpellers. *Angewandte Chemie International Edition*. 2013;52:13813-7.
- [318] Eliasof S, Lazarus D, Peters CG, Case RI, Cole RO, Hwang J, et al. Correlating preclinical animal studies and human clinical trials of a multifunctional, polymeric nanoparticle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110:15127-32.
- [319] Morales AR, Luchita G, Yanez CO, Bondar MV, Przhonska OV, Belfield KD. Linear and nonlinear photophysics and bioimaging of an integrin-targeting water-soluble fluorenyl probe. *Organic & biomolecular chemistry*. 2010;8:2600-8.
- [320] Biswas S, Wang X, Morales AR, Ahn H-Y, Belfield KD. Integrin-targeting block copolymer probes for two-photon fluorescence bioimaging. *Biomacromolecules*. 2010;12:441-9.
- [321] Ftouni H, Bolze F, de Rocquigny H, Nicoud J-F. Functionalized Two-Photon Absorbing Diketopyrrolopyrrole-Based Fluorophores for Living Cells Fluorescent Microscopy. *Bioconjugate Chemistry*. 2013;24:942-50.
- [322] Andrade CD, Yanez CO, Ahn H-Y, Urakami T, Bondar MV, Komatsu M, et al. Two-photon fluorescence vascular bioimaging with new bioconjugate probes selective toward the vascular endothelial growth factor receptor 2. *Bioconjugate chemistry*. 2011;22:2060-71.
- [323] Sumalekshmy S, Fahrni CJ. Metal-Ion-Responsive Fluorescent Probes for Two-Photon Excitation Microscopy. *Chemistry of Materials*. 2011;23:483-500.
- [324] Sarkar AR, Kang DE, Kim HM, Cho BR. Two-Photon Fluorescent Probes for Metal Ions in Live Tissues. *Inorganic Chemistry*. 2014;53:1794-803.
- [325] De Geest BG, Sanders NN, Sukhorukov GB, Demeester J, De Smedt SC. Release mechanisms for polyelectrolyte capsules. *Chemical Society Reviews*. 2007;36:636-49.
- [326] Esfand R, Tomalia DA. Poly (amidoamine)(PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug discovery today*. 2001;6:427-36.

- [327] Cho YW, Kim JD, Park K. Polycation gene delivery systems: escape from endosomes to cytosol. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 2003;55:721-34.
- [328] Strausbaugh LJ. Intracarotid infusions of protamine sulfate disrupt the blood-brain barrier of rabbits. *Brain research*. 1987;409:221-6.
- [329] Zhong D, Jiao Y, Zhang Y, Zhang W, Li N, Zuo Q, et al. Effects of the gene carrier polyethyleneimines on structure and function of blood components. *Biomaterials*. 2013;34:294-305.
- [330] Parhamifar L, Larsen AK, Hunter AC, Andresen TL, Moghimi SM. Polycation cytotoxicity: a delicate matter for nucleic acid therapy—focus on polyethylenimine. *Soft Matter*. 2010;6:4001-9.
- [331] Nottelet B, Patterer M, François B, Schott M-A, Domurado M, Garric X, et al. Nanoaggregates of Biodegradable Amphiphilic Random Polycations for Delivering Water-Insoluble Drugs. *Biomacromolecules*. 2012;13:1544-53.
- [332] Lv H, Zhang S, Wang B, Cui S, Yan J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *Journal of Controlled Release*. 2006;114:100-9.
- [333] Nakamoto K, Tsuboi M, Strahan GD. *Drug-DNA interactions: structures and spectra*. John Wiley & Sons; 2008.
- [334] Benesi HA, Hildebrand JH. A Spectrophotometric Investigation of the Interaction of Iodine with Aromatic Hydrocarbons. *Journal of the American Chemical Society*. 1949;71:2703-7.
- [335] Sirajuddin M, Ali S, Badshah A. Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2013;124:1-19.
- [336] Vijayalakshmi R, Kanthimathi M, Subramanian V, Nair BU. Interaction of DNA with [Cr(Schiff base)(H₂O)₂]ClO₄. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2000;1475:157-62.
- [337] Dragan A, Pavlovic R, McGivney J, Casas-Finet J, Bishop E, Strouse R, et al. SYBR Green I: fluorescence properties and interaction with DNA. *J Fluoresc*. 2012;22:1189-99.
- [338] Pjura PE, Grzeskowiak K, Dickerson RE. Binding of Hoechst 33258 to the minor groove of B-DNA. *Journal of Molecular Biology*. 1987;197:257-71.
- [339] Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2004;3:436-50.
- [340] Miyaura N, Suzuki A. PALLADIUM-CATALYZED REACTION OF 1-ALKENYLBORONATES WITH VINYLIC HALIDES-(1Z, 3E)-1-PHENYL-1, 3-OCTADIENE-(BENZENE, 1, 3-OCTADIENYL,(Z, E)). *Organic Syntheses*. 1990;68:130-7.
- [341] Chanteau SH, Tour JM. Synthesis of anthropomorphic molecules: the NanoPutians. *The Journal of organic chemistry*. 2003;68:8750-66.
- [342] Rasband WS. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. <http://rsbinfo.nih.gov/ij/>. 1997-2011.
- [343] Rumi M, Perry JW. Two-photon absorption: an overview of measurements and principles. *Advances in Optics and Photonics*. 2010;2:451-518.
- [344] Hermann JP, Ducuing J. Absolute Measurement of Two-Photon Cross Sections. *Physical Review A*. 1972;5:2557-68.
- [345] Sreeja R, John J, Aneesh PM, Jayaraj MK. Linear and nonlinear optical properties of luminescent ZnO nanoparticles embedded in PMMA matrix. *Optics Communications*. 2010;283:2908-13.
- [346] Crosby GA, Demas JN. Measurement of photoluminescence quantum yields. Review. *The Journal of Physical Chemistry*. 1971;75:991-1024.

- [347] Fischer M, Georges J. Sources of errors in the use of calorimetric references for photothermal spectroscopic methods. *Analytica Chimica Acta*. 1996;334:337-44.
- [348] Boens N, Qin W, Basarić N, Hofkens J, Ameloot M, Pouget J, et al. Fluorescence Lifetime Standards for Time and Frequency Domain Fluorescence Spectroscopy. *Analytical Chemistry*. 2007;79:2137-49.
- [349] Würth C, Grabolle M, Pauli J, Spieles M, Resch-Genger U. Relative and absolute determination of fluorescence quantum yields of transparent samples. *Nat Protocols*. 2013;8:1535-50.
- [350] Isak SJ, Eyring EM. Fluorescence quantum yield of cresyl violet in methanol and water as a function of concentration. *The Journal of Physical Chemistry*. 1992;96:1738-42.
- [351] Chen RF. Fluorescence Quantum Yields of Tryptophan and Tyrosine. *Analytical Letters*. 1967;1:35-42.
- [352] Williams ATR, Winfield SA, Miller JN. Relative fluorescence quantum yields using a computer-controlled luminescence spectrometer. *Analyst*. 1983;108:1067-71.
- [353] Bollinger LM, Thomas GE. Measurement of the Time Dependence of Scintillation Intensity by a Delayed-Coincidence Method. *Review of Scientific Instruments*. 1961;32:1044-50.
- [354] Becker W. Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Techniques. Springer Series in Chemical Physics. 2005;81:359.
- [355] Gratton E, Jameson DM, Hall RD. Multifrequency Phase and Modulation Fluorometry. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*. 1984;13:105-24.
- [356] Li B, Lin H, Chen D, Wilson BC, Gu Y. Singlet oxygen detection during photosensibilisation. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. 2013;06:1330002.
- [357] Spiller W, Kliesch H, Woehrle D, Hackbarth S, Roeder B, Schnurpfeil G. Singlet oxygen quantum yields of different photosensitizers in polar solvents and micellar solutions. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. 1998;2:145-58.
- [358] Schmidt R, Tanielian C, Dunsbach R, Wolff C. Phenalenone, a universal reference compound for the determination of quantum yields of singlet oxygen $O_2(^1\Delta_g)$ sensitization. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 1994;79:11-7.

Annexes

I Annexe n°1 : Partie expérimentale

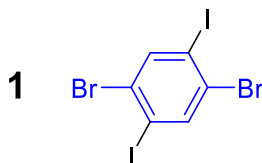
I.1) Synthesis

I.1.a) Materials and methods

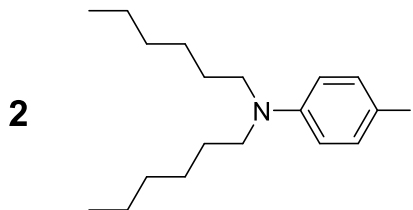
All solvents are used as received from the supplier. Dry solvents are obtained with a solvent station by passage through an activated alumina column followed by argon flush (THF, CH₂Cl₂ and Toluene). Commercially available product used as received from the suppliers (*naming italic*). Before use *copper (I) bromide* (Aldrich, 98%) is suspended in glacial acetic acid, filtered and washed with acetic acid then thoroughly rinsed with ethanol. After extensive drying under vacuum it is stored at 4°C under argon before to use. PdCl₂(PPh₃)₂ is synthesized from PdCl₂[340]. *Hydroxyethylacrylate* (HEA) is extracted and distilled at reduced pressure and is passed through a short pad of alumina to remove the stabilizer and oligomer[282]. Column Chromatographies are performed with Merck Gerduran 60 (40-63 μm) silica. NMR spectra (¹H, ¹³C) of the products are recorded at room temperature on a BRUKER 200 AVANCE, BRUKER 300 AVANCE and BRUKER 500 respectively. Data are listed in parts per million (ppm) and are reported relative to tetramethylsilane (¹H, ¹³C), residual solvent peaks being used as internal standard. HRMS measurements are performed by ESI-TOF: a Bruker Daltonics® Micro TOF-Q II is used with a resolution of 8000, in positive mode with a capillary tension of 4500V, a source temperature of 180°C, and a cone tension of 60V. The internal reference used for calibration is sodium formate. Elemental analyses are performed on a Flash EA1112 CHNS/O Thermo Electron micro-analyzer. Polymers are analyzed by size exclusion chromatography (SEC) in DMF (+ LiBr, 1 g·L⁻¹) at 60°C, at a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹ and at a concentration close to 6 mg·mL⁻¹ after filtration through 0.2 μm pore size membrane. The steric exclusion chromatography is carried out on two PSS GRAM 1000 Å columns (8 × 300 mm; separation limits: 1 to 1000 kg·mol⁻¹) and one PSS GRAM 30 Å (8 × 300 mm; separation limits: 0.1 to 10 kg·mol⁻¹) coupled with a differential refractive index (RI) detector, a viscosimeter (Viscotek, Dual 250) and a light scattering (LS) detector (MiniDawn from Wyatt Technology, laser λ = 690 nm at 90°, 45° and 135°). The polydispersity indexes (PDI = M_w/M_n) of the samples are derived from the RI signal by a calibration curve based on PMMA standards (Polymer Standards Service). The number-average molar mass (M_n) are calculated from RI signals with the OmniSEC 4.6 software. Polymer size (M_n) is also calculated with ¹H spectroscopy, by comparison of the integration values found for the methyl end-groups of the

initiator. FTIR spectra (ATR) are performed on samples using a JASCO FT/IR 4100 spectrometer equipped with a JASCO ATR PRO450-S ATR module.

I.1.b) Poly-bromide derivative

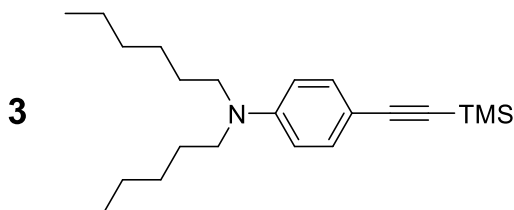


1: To a solution of *dibromo-benzene* (20 g, 78 mmol) in concentrated *sulfuric acid* (250 mL) *iodine* (93 g, 234 mmol) is slowly added after the dissolution of *dibromobenzene* at 100°C. The mixture is refluxed during two days. During the reaction, sublimation of materials appears and the materials need to be regularly scratched out from the reflux condenser, into the solution. After cooling the solution at room temperature, the solution is neutralized by adding caustic soda (5M, 1L) then saturated sodium carbonate solution. The basic pH is controlled with pH paper. The excess of iodine is quenched by addition of sodium thiosulfate. The disappearance of iodine is controlled by potassium iodide starch paper. The aqueous solution is extracted three with diethyl ether. The resulting organic phase is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄, filtered and solvents are removed under reduced pressure. The product is purified by recrystallization in toluene to afford the desired compound as white solid (65%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, ppm) δ 8.03 (s, 1H). Procedure modified from [341].

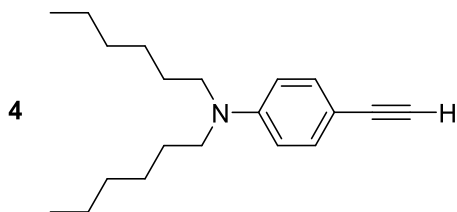


2: 4-iodoaniline (17 g, 77.6 mmol), NaI (27.4 g, 266 mmol) and dry K₂CO₃ (32.2 mmol, 233 mmol) are dissolved in DMF (180 mL). 1-bromohexane (42 mL, 310 mmol) is added. The solution is stirred during 20 hours at 95°C. After cooling at room temperature, distilled water is added. The solution is extracted with ether and organic layer is washed with water and then with brine. After drying on anhydrous Na₂SO₄, the solution is filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude material is purified by flash chromatography on silica gel (PE/CH₂Cl₂: 95/0.5) to provide a yellow oil (19.8 g, 66 %). TLC: (PE / CH₂Cl₂: 95/5) R_f = 0.65. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ

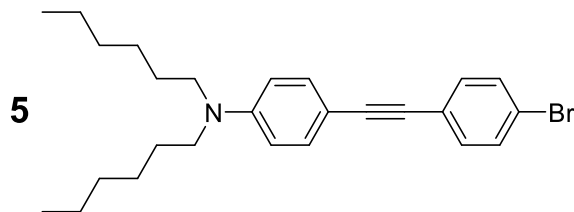
7.39 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.38 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 3.19 (t, $J = 7.6$ Hz, 4H), 1.52 (m, 4H), 1.28 (m, 12H), 0.88 (t, $J = 6.5$ Hz, 6H).



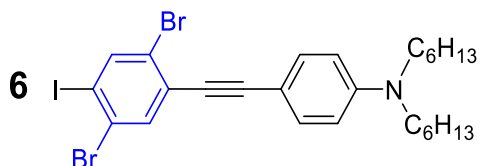
3: **2** (9.1 g, 23.5 mmol) is dissolved in piperidine (30 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (165 mg, 0.23mmol) and CuI (134 mg, 0.69mmol) are added. Then TMSA (4.3 mL, 30.5 mmol) is introduced through the septum via a syringe. The solution is stirred overnight at room temperature during 12 hours. The solution is quenched by addition of NH_4Cl solution. The solution is extracted three times with ethyl acetate. The organic layer is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na_2SO_4 filtered and solvents are removed under reduced pressure to afford the desired compound as yellow oil (8.6 g, 100 %). TLC: PE / CH_2Cl_2 : 9/1. $R_f = 0.8$. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 7.27 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 6.48 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 3.22 (t, $J = 7.6$ Hz, 4H), 1.53 (m, 4H), 1.28 (m, 12H), 0.87 (t, $J = 6.5$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 148.08, 133.26, 111.00, 108.55, 106.85, 90.77, 50.92, 31.71, 27.16, 26.80, 22.67, 14.04, 0.27. HRMS calcd. for $[\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{NSi}+\text{H}^+]$ 358.2925, found 358.2910



4: A molar solution of TBAF in THF (27.6mL, 27.6 mmol) is added to a solution of **3** (8.6 g, 24 mmol) in Et_2O (50mL). The mixture is stirred for 10 min at room temperature and the solution is filtered through a short pad of silica gel and eluted with Et_2O . The resulting solution is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na_2SO_4 filtered and solvents are removed under reduced pressure to afford the desired compound as yellow brown oil (7.56g, 96%). ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 7.30 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.50 (d, $J = 9$ Hz, 2H), 3.23 (t, $J = 7.5$ Hz, 4H), 2.93 (s, 1H), 1.55 (m, 4H), 1.29 (m, 12H), 0.88 (t, $J = 6.5$ Hz, 6H).

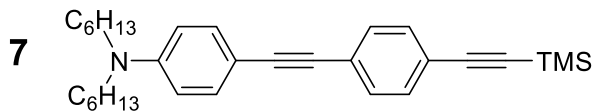


5: **4** (2.6 g, 9.1 mmol) and 1-bromo-4-iodobenzene (1.98 g, 7.0 mmol) are dissolved in 1:1. vol/vol THF/Et₃N (80 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. Pd(PPh₃)₂Cl₂ (98 mg, 2%) and CuI (53 mg, 4%) were added. Then *TMSA* (4.3 mL, 30.5 mmol) is introduced through the septum via a syringe. The solution is stirred overnight at 85°C during 12 hours. Solvents are removed under reduced pressure and dissolved in AcOEt. The resulting solution is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt. The resulting solution is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄, filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (PE / CH₂Cl₂: 9/1) to afford the desired compound as yellow oil (1.85, 60%). TLC: (PE / CH₂Cl₂: 9/1) R_f = 0.3. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.42 (d, 2H), 7.32 (m, 4H), 6.54 (d, 2H), 3.25 (t, 4H), 1.53 (m, 4H), 1.29 (m, 12H), 0.88 (t, 6H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 148.13, 132.92, 132.67, 131.46, 123.43, 121.31, 111.24, 108.27, 92.24, 86.15, 51.00, 31.75, 27.23, 26.85, 22.73, 14.11. HRMS calcd. for [C₂₆H₃₄BrN+H⁺] 440.1947, found 440.1937.

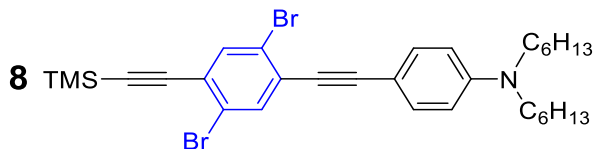


6: **4** (1.46 g, 5.1 mmol) and **1** (9.97 g, 20.4 mmol) are dissolved in 1:5:2.5 vol/vol/vol THF/Toluene/Et₃N (170 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. Pd(PPh₃)₂Cl₂ (72 mg, 2%) and CuI (38.9 mg, 4%) were added. The solution is stirred overnight at room temperature during 12 hours. Solvents are removed under reduced pressure and the crude product is dissolved in AcOEt. The resulting solution is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt. The resulting solution is washed one time with saturated NH₄Cl solution, three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄, filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (PE / CH₂Cl₂: 10/0.5. solid deposition of the product pre-adsorbed on silica gel) to afford the desired compound as yellow brown oil (1.7g, 51%). TLC: (PE / CH₂Cl₂: 10/0.5) R_f = 0.6. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 8.02 (s, 2H), 7.69 (s, 2H), 7.36 (d, 2H), 6.55 (d,

2H), 3.26 (t, 4H), 1.52 (m, 4H), 1.30 (m, 12H), 0.86 (t, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 148.70, 142.50, 135.17, 133.35, 128.21, 128.15, 123.90, 111.28, 107.47, 99.43, 98.86, 84.84, 51.11, 31.84, 27.31, 26.91, 22.83, 14.20. HRMS (ESI) calcd for $[\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{Br}_2\text{IN} + \text{H}^+]$ 645.9946, found 645.9982.

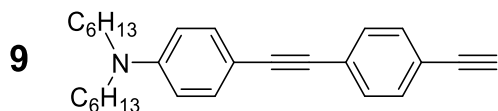


7: 5 (1.1 g, 2.5 mmol) is dissolved in 1:1 vol/vol Toluene/ Et_3N (16 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (35 mg, 2%) and CuI (19 mg, 4%) are added. Then *TMSA* (0.5 mL, 3.71 mmol) is introduced through the septum via a syringe. The solution is stirred overnight at room temperature during 12 hours. Solvents are removed under reduced pressure and the crude product is dissolved in AcOEt . The resulting solution is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt . The resulting solution is washed one time with saturated NH_4Cl solution, three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na_2SO_4 , filtered and solvents are removed under reduced pressure to afford the desired compound as yellow brown oil (1.14 g, 100%). ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 7.38 (s, 4H), 7.32 (d, 2H), 6.54 (d, 2H), 3.25 (t, 4H), 1.52 (m, 4H), 1.29 (m, 12H), 0.86 (t, $J = 6.5$ Hz, 6H), 0.23 (s, 9H).

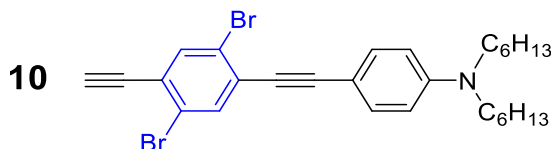


8: 6 (500 mg, 0.77 mmol) is dissolved in 1:1 vol/vol Toluene/ Et_3N (14 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (10 mg, 2%) and CuI (6 mg, 4%) are added. Then *TMSA* (0.14 mL, 1.00 mmol) is introduced through the septum via a syringe. The solution is stirred overnight at room temperature during 12 hours. Solvents are removed under reduced pressure and the crude product is dissolved in AcOEt . The resulting solution is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt . The resulting solution is washed one time with saturated NH_4Cl solution, three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na_2SO_4 , filtered and solvents are removed under reduced pressure to afford the desired compound as yellow brown oil (474 mg, 100%). ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 7.66 (s, 2H), 7.37 (d, 2H), 6.55 (d, 2H), 3.26 (t, 4H), 1.52 (m, 4H), 1.30 (m, 12H), 0.88 (t, 6H), 0.25 (s, 9H). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): δ 149.39, 137.09, 136.06,

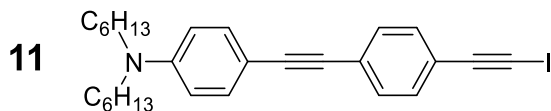
134.11, 125.61, 124.51, 123.76, 111.92, 108.18, 100.12, 93.00, 92.42, 86.05, 51.73, 32.45, 27.92, 23.43, 14.78, 0.27. HRMS (MALDI) m/z , calcd for $[M]^+$ 613.1375, found 613.1370.



9: A molar solution of *TBAF* in THF (2.33 mL, 2.33 mmol) is added to a solution of **7** (600 mg, 1.56 mmol) in Et₂O (20mL). The mixture is stirred for 10 min at room temperature and the solution is filtered through a short pad of silica gel and eluted with Et₂O. The resulting solution is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄ filtered and solvents are removed under reduced pressure to afford the desired compound as yellow brown oil (516 mg, 86%). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.41 (s, 4H), 7.33 (d, 2H), 6.54 (d, 2H), 3.25 (t, 4H), 3.12 (s, 1H), 1.52 (m, 4H), 1.29 (m, 12H), 0.88 (t, 6H).

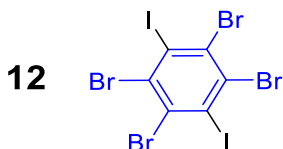


10: A molar solution of *TBAF* in THF (1 mL, 1 mmol) is added to a solution of **8** (400 mg, 0.65 mmol) in Et₂O (15mL). The mixture is stirred for 10 min at room temperature and the solution is filtered through a short pad of silica gel and eluted with Et₂O. The resulting solution is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄ filtered and solvents are removed under reduced pressure to afford the desired compound as yellow brown oil (328 mg, 93%). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.41 (s, 4H), 7.33 (d, 2H), 6.54 (d, 2H), 3.25 (t, 4H), 3.12 (s, 1H), 1.52 (m, 4H), 1.29 (m, 12H), 0.88 (t, J = 6.2 Hz, 6H).

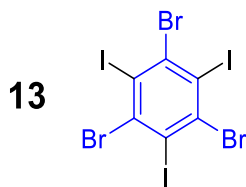


11: **9** (100 mg, 0.26 mmol) is dissolved in 2 mL of dry THF. The solution is degassed by bubbling argon for 10 min purged with argon and cooled to -78°C. *BuLi* (0.24 mL of a 2.6 mol.L⁻¹ solution in hexane, 0.62 mmol) is added dropwise by syringe through the septum and the reaction mixture is stirred for 45 min at -78°C. After waiting the temperature returns to -10°C, I₂ (198 mg, 0.78 mmol) dissolved in 2 mL of dry THF is added and the reaction mixture was stirred for 30 min at -

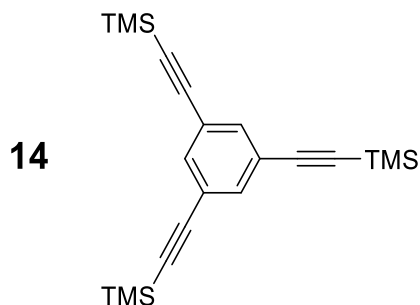
10°C and warmed to room temperature. The reaction is quenched with a solution of saturated $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, extracted with ether, washed with water, dried with anhydrous Na_2SO_4 , filtrated, and concentrated under reduced pressure. The crude material is poured in petroleum ether: a green solid precipitated. After filtration and evaporation of the filtrate, the product is purified by flash chromatography on silica gel ($\text{PE}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$: 10/1) to provide a brown oil, (62 mg, 46 %). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 7.38 (m, 6H), 6.55 (d, 2H), 3.26 (t, 4H), 1.56 (m, 4H), 1.30 (m, 12H), 0.89 (t, $J = 6.7$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 148.3, 133.2, 132.4, 131.2, 125.2, 122.2, 111.4, 108.4, 94.3, 93.8, 87.1, 51.2, 32.0, 27.4, 27.1, 23.0, 14.3, 8.0.



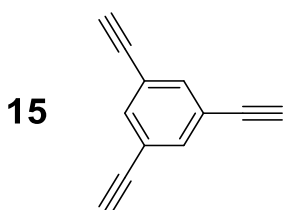
12: *1,2,4,5-tetrabromobenzene* (6 g, 15.2 mmol) is dissolved in concentrated sulfuric acid (35mL). In a RB flask iodine (21.3 g, 84 mmol) and potassium iodate (2.55 g, 12 mmol) are mixed in sulfuric acid (30mL). The two solution are combined and stirred during five days. The reaction is stopped and neutralized by adding 200mL of caustic soda (5M). The neutralization is completed with saturated sodium carbonate solution. The excess of iodine is quenched by addition of sodium thiosulfate. The disappearance of iodine is controlled by potassium iodide starch paper. A solid is obtained, filtered and washed several times with water. The solid is dried in oven (100°C). The product is purified by recrystallization in toluene to afford the desired compound as white solid (8.08 g, 82%). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 168.9, 150.9. Tf: 330°C.



13: Periodic acid (27.36g, 120mmol) is dissolved in concentrated sulfuric acid (410 mL) then gold to 0°C. Potassium iodine (59.7 g, 23.5 mmol) is added by portion in one hour then *1,3,5-tribromobenzene* (12,59 g, 40 mmol) in 25 min. The solution is stirred during three days at room temperature. The solution is poured in an ice bath, filtered and extensively washed with water and cooled methanol. The excess of iodine is quenched by addition of sodium thiosulfate. The product is purified by recrystallization in 1:1 vol/vol pyridine/ethanol to afford the desired compound as slightly yellow solid (20.5 g, 74%). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 176.3, 145.9. Tf: 267°C.

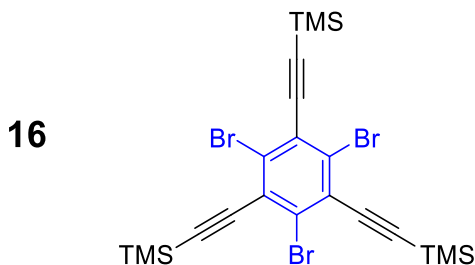


14: *1,3,5-tribromobenzene* (500 mg, 1.6 mmol) is dissolved in Et_3N (20 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (50 mg, 2%) and CuI (27 mg, 4%) are added. Then *TMSA* (0.8 mL, 5.8 mmol) is introduced through the septum via a syringe. The solution is stirred and heated in a microwave oven at 100°C during 6 hours. Solvents are removed under reduced pressure and the crude product is dissolved in AcOEt . The resulting solution is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt . The resulting solution is washed one time with saturated NH_4Cl solution, three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na_2SO_4 , filtered, solvents are removed under reduced pressure. The product is purified on silica gel ($\text{PE} / \text{CH}_2\text{Cl}_2$: 9/1, solid deposition of the product pre-adsorbed on silica gel) to afford the desired compound as yellow solid (mg, 95%). TLC: $\text{PE}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$: 9/1, $R_f = 0.4$. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 7.47(s, 1H), 0.21 (s, 27H). ^{13}C NMR (126.3 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 129.3, 127.7, 107.0, 102.1, 0.0. HRMS calcd for $[\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{Si}_3 + \text{H}]^+$ at 367.1728 found 367.1726. Elemental analysis calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{Si}_3$: C, 68.78, H, 8.25, found C, 68.74, H, 8.24.

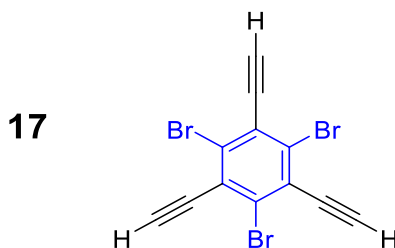


15: **14** (150 mg, 1.09 mmol) is dissolved in 1:1 vol/vol THF/MeOH (20 mL) and K_2CO_3 (169 mg, 3.28 mmol) is added in one portion. The mixture is stirred during two hours. The resulting solution is put into distilled water and extracted three times with AcOEt . The resulting organic phase is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na_2SO_4 , filtered and solvents are removed under reduced pressure to afford the desired compound as slightly yellow oil (62 mg, 37%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , ppm):

δ 7.55 (s, 3H), 3.09 (s, 3H). This sensitive product is involved in next step without additional characterization

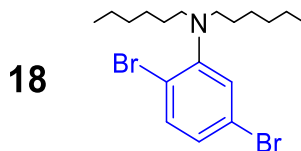


16: **13** (0.3 mg, 0.44 mmol) is dissolved in Et₃N (15 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. Pd(PPh₃)₂Cl₂ (6 mg, 2%) and CuI (3 mg, 4%) are added. Then *TMSA* (0.18 mL, 1.32 mmol) is introduced through the septum via a syringe. The solution is stirred and heated in a microwave oven at 100°C during 12 hours. Solvents are removed under reduced pressure and the crude product is dissolved in AcOEt. The resulting solution is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt. The resulting solution is washed one time with saturated NH₄Cl solution, three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄, filtered, solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (PE. solid deposition of the product pre-adsorbed on silica gel) to afford the desired compound as yellow solid (100 mg, 42%). TLC: PE, R_f = 0.25. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, ppm): δ 0.27 (s, 27H). ¹³C NMR (126.3MHz, CDCl₃, ppm): δ 129.2, 127.6, 106.9, 101.9, 0.0. HRMS calcd for [C₂₁H₂₇Br₃Si₃ + Na]⁺ at 622.8863 found 622.8882. Elemental analysis calcd for C₂₁H₂₇Br₃Si₃: C, 41.80, H, 4.51, found C, 41.79, H, 4.52.

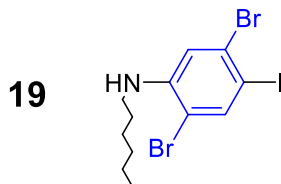


17: **16** (50 mg, 0.08mmol) is dissolved in 1:1 vol/vol THF/MeOH (10 mL) and K₂CO₃ (300 mg, 0.75 mmol) is added in one portion. The mixture is stirred during two hours. The resulting solution is poured into distilled water and extracted three times with AcOEt. The resulting organic phase is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄, filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (PE / CH₂Cl₂: 9/1) to afford the desired compound as slightly

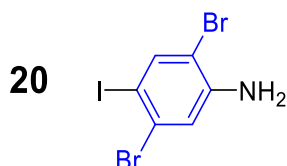
yellow oil (32 mg, 100%). TLC: PE / CH₂Cl₂: 9/1. R_f = 0.20. Used directly without another characterization.



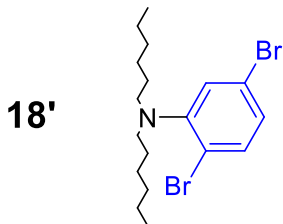
18: 2,5dibromo-aniline (2 g, 4.77mmol), 1-bromohexane (2.36 g, 14.31 mmol), and of 15-crown-5 (0.5 mL, 2.81mmol) are dissolved in dry THF (50 mL). Oil-free NaH (washed by petroleum ether, 340 mg, 14.31 mmol) is added gradually over several minutes as a solid. The purple reaction mixture is refluxed for 20 hours. The reaction is cooled to room temperature and quenched slowly with water. The resulting solution is extracted three times with CH₂Cl₂. The resulting organic phase is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄, filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (Pentane) to afford the desired compound as colorless oil (1.2 g, 60%). TLC: Pentane. R_f = 0.90. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, ppm): δ 7.37 (d, 1H), 7.15 (d, 1H), 6.99 (t, 1H), 2.99 (t, 4H), 1.42 (t, 4H), 1.23 (m, 12H), 0.85 (t, 6H). ¹³C NMR (126.3MHz, CDCl₃, ppm): δ 151.5, 134.9, 127.5, 127.2, 121.3, 120.7, 53.3, 31.9, 27.1, 27.0, 22.9, 14.2.



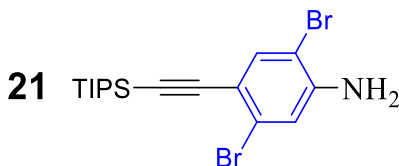
19: **18** (400 mg, 0.95 mmol) are dissolved in 20mL of DMSO. *N*-iodosuccinimide (895 mg, 3.80 mmol) is added by portion during 20 minutes. The mixture is stirred during 3 days at room temperature. The solution is dissolved in 100mL of water and extracted three times with AcOEt (30mL). The resulting organic phase is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄ filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel to afford the desired compound as brown oil (99%). ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, ppm): δ 7.72(s, 1H), 6.81 (s, 1H), 4.30 (s, 1H), 3.05 (t, 2H), 1.62 (t, 2H), 1.32 (m, 6H), 0.89 (t, 3H).



20: 2,5di-*bromoaniline* (15 g, 59.8mmol) are dissolved in 200mL of DMSO. *N*-iodosuccinimide (13.45g, 60mmol) is added by portion during 20 minutes. The mixture is stirred during 3 days at room temperature. The solution is dissolved in 500mL of water and extracted three times with AcOEt (100mL). The resulting organic phase is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄ filtered and solvents are removed under reduced pressure to afford the desired compound as brown solid (22.5 mg, 99%). ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, ppm): δ 7.76(s, 1H), 7.02 (s, 1H), 4.15 (s, 2H). ¹³H NMR (126.3MHz, CDCl₃, Ppm): δ 145.31, 142.09, 129.05, 118.76, 108.67, 85.40. HRMS calcd for [C₆H₄Br₂IN + H]⁺ at 375.7828 found 375.7834. Elemental analysis calcd for C₆H₄Br₂IN: C, 19.13, H, 1.07, N, 3.72 found C, 19.17, H, 1.04, N, 3.49. Procedure modified from [237].

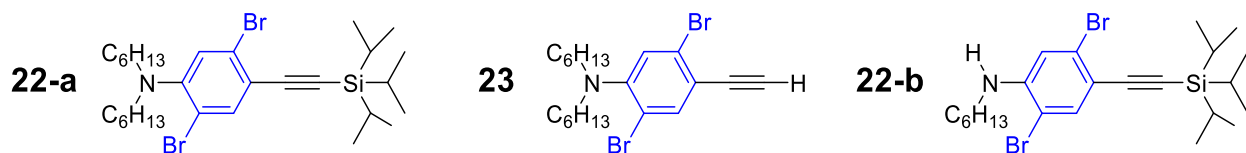


18': **20** (1g, 2.65 mmol), *1-bromohexane* (1.49 mL, 10.6 mmol), and *15-crown-5* (0.30 mL, mmol) are dissolved in dry THF (30 mL). Oil-free NaH (washed by petroleum ether, 133 mg, 5.56 mmol) is added gradually over several minutes as a solid. The purple reaction mixture is refluxed for 20 hours. The reaction is cooled to room temperature and quenched slowly with water. The resulting solution is extracted three times with CH₂Cl₂. The resulting organic phase is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄, filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (Pentane) to afford the desired compound as colorless oil (830 mg, 75%). TLC: Pentane. R_f = 0.9. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, ppm): δ 7.37 (d, 1H), 7.15 (d, 1H), 6.99 (t, 1H), 2.99 (t, 4H), 1.42 (t, 4H), 1.23 (m, 12H), 0.85 (t, 6H). ¹³H NMR (126.3MHz, CDCl₃, ppm): δ 151.5, 134.9, 127.5, 127.2, 121.3, 120.7, 53.3, 31.9, 27.1, 27.0, 22.9, 14.2.



21: To solution of *iodo-dibromoaniline* (5g, 13.27mmol) in 1:1. vol/vol dry THF/Et₃N (50 mL), extensively degassed by argon bubbling, PdCl₂(PPh₃)₂(93mg, 0.13 mmol, 0.01 eq.) CuI (50mg,

0.27mmol, 0.02eq.) and *triisopropylsilylacetylene* (3.87mL, 17.25mmol, 1.3 eq.) are added. The tube is sealed and the mixture is stirred overnight at room temperature. The resulting solution is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt. The resulting solution is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄ filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (PE / CH₂Cl₂: 8/1. solid deposition of the product pre-adsorbed on silica gel). to afford the desired compound as yellow solid (95%). TLC: PE / CH₂Cl₂: 8/1. R_f = 0.15. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃. ppm): δ 7.52(s, 1H), 6.93 (s, 1H), 4.24 (s, 2H), 1.11 (s, 21H). ¹³H NMR (126.3MHz, CDCl₃. ppm): δ 144.9, 137.0, 125.5, 118.1, 116.3, 106.9, 104.0, 93.9, 18.7, 11.4.



22-a, 22-b, 23: **21** (1.1 g, 2.55 mmol), 1-bromohexane (0.90 mL, 6.38 mmol), and of 15-crown-5 (0.25 mL, 1.41 mmol) are dissolved in dry THF (25 mL). Oil-free NaH, washed by PE, (127 mg, 5.10 mmol) is added gradually over several minutes as a solid. The purple reaction mixture is refluxed for 20 hours. The reaction is cooled to room temperature and quenched slowly with water. The resulting solution is extracted three times with CH₂Cl₂. The resulting organic phase is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄, filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (PE / CH₂Cl₂: 9/1) to afford the desired compounds as colorless oil **22-a**, (535 mg, 35%) **22-b**(330 mg, 25%) **23**(215 mg, 19%).

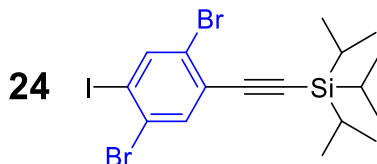
23: A molar solution of *TBAF* in THF (1.25 mL, 1.25 mmol) is added to a solution of **22-a** (500 mg, 0.83 mmol) in Et₂O (20mL). The mixture is stirred for 10 min at room temperature and the solution is filtered through a short pad of silica gel and eluted with Et₂O. The resulting solution is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄ filtered and solvents are removed under reduced pressure to afford the desired compound as yellow brown oil (370 mg, 100%).

22-a: TLC: PE / CH₂Cl₂: 9/1. R_f = 0.45. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃. ppm): δ 7.64 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 3.14 (t, 4H), 1.41 (t, 4H), 1.26 (m, 12H), 1.12 (s, 21H), 0.85 (t, 6H). ¹³H NMR (126.3MHz, CDCl₃. ppm): δ 150.8, 138.1, 127.0, 124.6, 120.6, 118.9, 103.8, 95.7, 52.8, 31.6, 26.8.1, 26.7, 22.6,

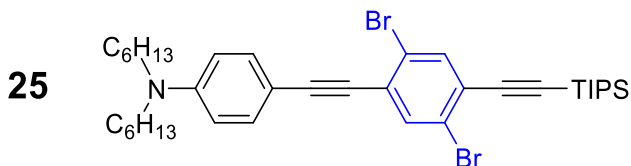
18.7, 14.1, 11.3. HRMS calcd for $[C_{29}H_{49}Br_2NSi + H]^+$ at 589.2074 found 598.2069. Elemental analysis calcd for $C_{29}H_{49}Br_2NSi$: C, 58.09, H, 8.24, N, 2.34 found C, 58.38, H, 8.15, N, 2.31.

22-b: TLC: PE / CH_2Cl_2 : 9/1. R_f = 0.30. 1H NMR (500MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 7.57 (s, 1H), 6.19 (s, 1H), 4.47 (t, 1H), 3.03 (t, 3H), 2.99 (t, 4H), 1.41 (t, 4H), 1.22 (m, 12H), 0.85 (t, 6H).

23: TLC: PE / CH_2Cl_2 : 9/1. R_f = 0.15. 1H NMR (500MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 7.66 (s, 1H), 7.16 (s, 1H), 3.30 (s, 1H), 3.03 (t, 3H), 2.99 (t, 4H), 1.41 (t, 4H), 1.22 (m, 12H), 0.85 (t, 6H).

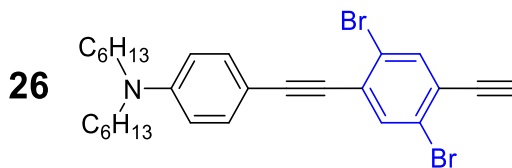


24: To solution of **21** (5.68g, 13.17mmol) in acetic acid (15 mL) concentrated sulfuric acid (4 mL) is slowly added. The vial is putted in ice bath. A solution of $NaNO_2$ (2.71g, 39.25 mol) in water (6mL) is added dropwise. The color of the solution turn to orange. After 1h of stirring at $0^\circ C$, a solution of KI (6.54g, 39.38mmol) in water (6mL) is slowly added at $0^\circ C$. The solution is stirred for 1h at room temperature. 50mL of NaOH aq. Solution (5M) are added. The neutralization is completed with saturated sodium carbonate solution. The solution is extracted three times with CH_2Cl_2 (50mL). The resulting organic phase is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na_2SO_4 , filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (PE, solid deposition of the product pre-adsorbed on silica gel) to afford the desired compound as slightly yellow oil (77%). TLC: PE. R_f = 0.95. 1H NMR (500MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 8.10(s, 1H), 7.74 (s, 1H), 1.19 (s, 21H). ^{13}C NMR (126.3MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 142.6, 136.2, 128.1, 127.1, 124.5, 102.7, 101.3, 99.5, 40.1, 11.2. HRMS calcd for $[C_{17}H_{23}Br_2ISi + H]^+$ at 540.9053 found 540.9056. Elemental analysis calcd for $C_{17}H_{23}Br_2ISi$: C, 37.66, H, 4.28 found C, 37.63, H, 4.39.

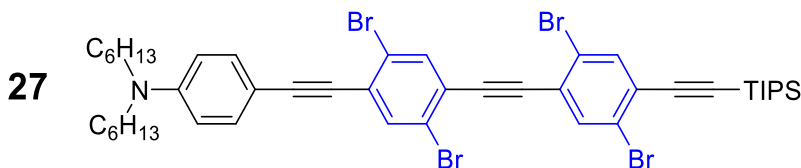


25: **24** (1.30 g, 2.40 mmol) and **4** (1 g, 3.5 mmol) are dissolved in 1:1 vol/vol dry THF/ Et_3N (40 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (80 mg, 2%) and CuI (37 mg, 4%) are added. The solution is stirred overnight at room temperature. Solvents are removed under reduced pressure and the crude product is dissolved in AcOEt. The resulting

solution is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt. The resulting solution is washed one time with saturated NH_4Cl solution, three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na_2SO_4 , filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (PE / CH_2Cl_2 : 9/1) to afford the desired compound as yellow oil (1.2 g, 71%). TLC: (PE / CH_2Cl_2 : 9/1) R_f = 0.33. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 7.74 (s, 2H), 7.44 (d, 2H), 6.62 (d, 2H), 3.32 (t, 4H), 1.63 (t, 4H), 1.37 (m, 12H), 1.20 (s, 21H), 0.96 (t, 6H).

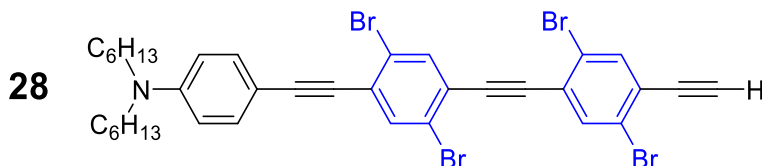


26: A molar solution of *TBAF* in *THF* (1.42 mL, 1.42 mmol) is added to a solution of **25** (500 mg, 0.71 mmol) in Et_2O (20mL). The mixture is stirred for 10 min at room temperature and the solution is filtered through a short pad of silica gel and eluted with Et_2O . The resulting solution is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na_2SO_4 filtered and solvents are removed under reduced pressure to afford the desired compound as yellow brown oil (388 mg, 86%). TLC: PE / CH_2Cl_2 : 9/1. R_f = 0.30. ^1H NMR (300MHz, CDCl_3 , ppm): δ 7.72(d, 2H), 7.41 (d, 2H), 6.58 (d, 2H), 3.47 (s, 1H), 3.30 (t, 4H), 1.60 (t, 4H), 1.34 (m, 12H), 0.93 (t, 6H).

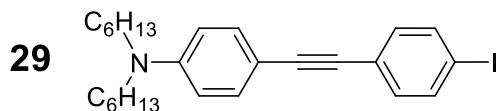


27: **24** (484 mg, 0.89 mmol) and **26** (404 mg, 0.74 mmol) are dissolved in 1:1 vol/vol dry $\text{THF}/\text{Et}_3\text{N}$ (50 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (40 mg, 2%) and CuI (18 mg, 4%) are added. The solution is stirred overnight at room temperature. Solvents are removed under reduced pressure and the crude product is dissolved in AcOEt. The resulting solution is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt. The resulting solution is washed one time with saturated NH_4Cl solution, three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na_2SO_4 , filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (PE / CH_2Cl_2 : 9/1) to afford the desired compound as yellow oil (710 mg, 76%). TLC: (PE / CH_2Cl_2 : 9/1) R_f = 0.6. ^1H

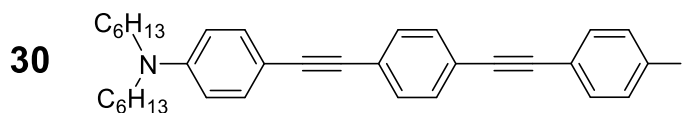
NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 7.69 (s, 2H), 7.64 (s, 2H), 7.32 (d, 2H), 6.49 (d, 2H), 3.21 (t, 4H), 1.50 (t, 4H), 1.25 (m, 12H), 1.08 (s, 21H), 0.83 (t, 6H). ^{13}C NMR (126.3 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 148.6, 136.7, 136.4, 135.4, 133.4, 128.6, 127.2, 125.8, 124.0, 123.7, 123.5, 123.2, 111.2, 107.4, 103.3, 100.5, 100.2, 93.8, 92.8, 85.5, 51.0, 31.7, 29.8, 27.2, 22.7, 18.1, 14.1, 11.3. HRMS calcd for $[\text{C}_{45}\text{H}_{55}\text{Br}_4\text{NSi} + \text{H}]^+$ at 954.0910 found 954.0913. Elemental analysis calcd for $\text{C}_{45}\text{H}_{55}\text{Br}_4\text{NSi}$: C, 56.44, H, 5.79, N, 1.46 found C, 56.37, H, 5.89, N, 1.42.



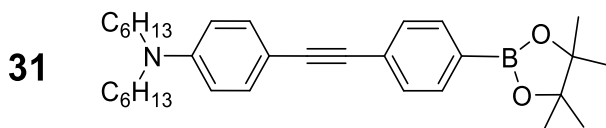
28: A molar solution of *TBAF* in THF (0.84 mL, 0.84 mmol) is added to a solution of **27** (400 mg, 0.42 mmol) in Et_2O (20 mL). The mixture is stirred for 10 min at room temperature and the solution is filtered through a short pad of silica gel and eluted with Et_2O . The resulting solution is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na_2SO_4 filtered and solvents are removed under reduced pressure to afford the desired compound as yellow brown oil (335 mg, 100%). TLC: PE / CH_2Cl_2 : 9/1. R_f = 0.50. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 7.80 (m, 4H), 7.41 (d, 2H), 6.59 (d, 2H), 3.53 (s, 1H) 3.33 (t, 4H), 1.59 (t, 4H), 1.34 (m, 12H), 0.93 (t, 6H).



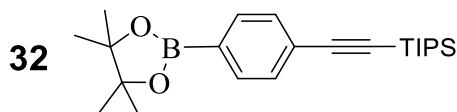
29: **4** (2.7 g, 9.46 mmol) and 1,4-iodobenzene (9.3 g, 28.4 mmol) are dissolved in 1:1. vol/vol THF/ Et_3N (100 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (133 mg, 2%) and CuI (72 mg, 4%) are added. The solution is stirred overnight at room temperature. Solvents are removed under reduced pressure and dissolve in AcOEt . The resulting solution is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt . The resulting solution is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na_2SO_4 , filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (PE then PE / CH_2Cl_2 : 9/1) to afford the desired compound as yellow oil (2.4, 52%). TLC: (PE / CH_2Cl_2 : 9/1) R_f = 0.35. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 7.65 (d, 2H), 7.36 (d, 2H), 7.22 (d, 2H), 6.58 (d, 2H), 3.29 (t, 4H), 1.58 (t, 4H), 1.34 (m, 12H), 0.92 (t, 6H).



30: **9** (0.5 g, 1.30 mmol) and *1,4-iodobenzene* (1.28 g, 3.89 mmol) are dissolved in 1:1. vol/vol THF/Et₃N (30 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. Pd(PPh₃)₂Cl₂ (18 mg, 2%) and CuI (10 mg, 4%) are added. The solution is stirred overnight at room temperature. Solvents are removed under reduced pressure and dissolve in AcOEt. The resulting solution is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt. The resulting solution is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄, filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (PE / CH₂Cl₂: 9/1) to afford the desired compound as yellow solid (213 mg, 23%). TLC: (PE / CH₂Cl₂: 9/1) R_f = 0.4. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.49 (m, 8H), 7.35 (d, 2H), 6.55 (d, 2H), 3.26 (t, 4H), 1.56 (t, 4H), 1.30 (s, 12H), 0.89 (t, 6H).

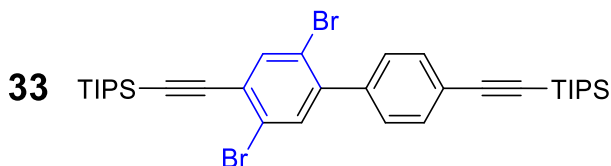


29: **4** (511 mg, 1.79 mmol) and *iodo-4-pinacolborane benzene* (394 mg, 1.19 mmol) are dissolved in 1:1. vol/vol THF/Et₃N (30 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. Pd(PPh₃)₂Cl₂ (17 mg, 2%) and CuI (9 mg, 4%) are added. The solution is stirred overnight at room temperature. Solvents are removed under reduced pressure and dissolve in AcOEt. The resulting solution is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt. The resulting solution is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄, filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (PE/CH₂Cl₂: 9/1) to afford the desired compound as yellow oil (355mg, 61%). TLC: (PE/CH₂Cl₂: 9/1) R_f = 0.7. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.75 (d, 2H), 7.47 (d, 2H), 7.36 (d, 2H), 6.56 (d, 2H), 3.26 (t, 4H), 1.57 (m, 4H), 1.34 (m, 22H), 0.90 (t, 6H).

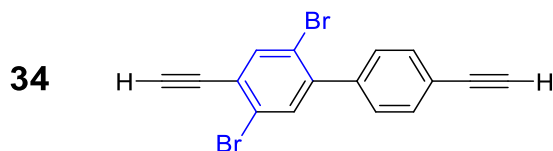


32: To solution of *iodo-4-pinacolborane benzene* (1g, 3.03 mmol) in 1:1. vol/vol dry THF/Et₃N (50 mL), extensively degassed by argon bubbling, PdCl₂(PPh₃)₂ (73 mg, 3 mol%) CuI (35 mg, 1 mol%) and *triisopropylsilylacetylene* (1.00 mL, 4.55 mmol) are added. The tube is sealed and the mixture

is stirred overnight at room temperature. The resulting solution is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt. The resulting solution is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄ filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (PE) to afford the desired compound as yellow solid (800 mg, 69%). TLC: PE. R_f = 0.3. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, ppm): δ 7.72 (d, 2H), 7.44 (d, 2H), 1.32 (s, 12H), 1.11 (s, 21H). ¹³H NMR (126.3MHz, CDCl₃, ppm): δ 134.5, 131.2, 126.2, 107.2, 92.1, 83.9, 24.9, 18.7, 11.4.

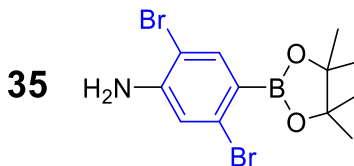


33: **32** (455 mg, 1.20 mmol) and **24** (500 g, 0.92 mmol) are dissolved in toluene (30 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. Pd(dppf) (100 mg, 0.12 mmol) and Cs₂CO₃ (600 mg, 1.84 mmol) are added. The reaction mixture is stirred overnight at 80°C. Solvents are removed under reduced pressure and dissolve in AcOEt. The mixture is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt. The resulting solution is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄, filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (Pentane) to afford the desired compound as yellow oil (280 mg, 45%). TLC: (Pentane) R_f = 0.85. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.76 (s, 1H), 7.51 (d, 2H), 7.49 (s, 1H), 7.29 (d, 2H), 1.21 (s, 42H). ¹³H NMR (126.3MHz, CDCl₃, ppm): δ 143.0, 139.1, 137.6, 134.2, 131.8, 129.1, 126.3, 124.6, 123.6, 120.5, 106.6, 103.1, 98.5, 92.0, 18.5, 11.2. HRMS calcd for [C₃₄H₄₈Br₂Si₂ + Na]⁺ at 693.1554 found 693.1566. Elemental analysis calcd for C₃₄H₄₈Br₂Si₂: C, 60.70, H, 7.19 found C, 61.2, H, 7.20.

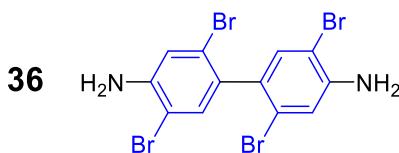


34: A molar solution of *TBAF* in THF (0.90 mL, 0.90 mmol) is added to a solution of **33** (200 mg, 0.30 mmol) in Et₂O (20mL). The mixture is stirred for 10 min at room temperature and the solution is filtered through a short pad of silica gel and eluted with Et₂O. The resulting solution is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄ filtered and solvents are removed under reduced pressure to afford

the desired compound as yellow brown oil (106 mg, 100%). TLC: Pentane. R_f = 0.4. Used directly without any characterization: the product seems very unstable.

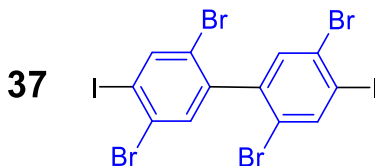


35: **20** (2 g, 5.34 mmol) and *bis(pinacol)-borane* (1.39 g, 5.87 mmol) are dissolved in DMSO (18 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. Pd(dppf) (90 mg, 0.11 mmol) and AcOK (1.47 g, 15 mmol) were added. The reaction mixture is stirred overnight at 90°C. Solvents are removed under reduced pressure and dissolve in AcOEt. The resulting mixture is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt. The resulting solution is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄, filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (PE/AcOEt/Et₃N: 85/10/5) to afford the desired compound as yellow oil (1.13g, 56%). TLC: (PE/AcOEt/Et₃N: 85/10/5) R_f = 0.3. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.75 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 4.33 (s, 2H), 1.38 (s, 12H). ¹³C NMR (126.3 MHz, CDCl₃, ppm): δ 147.1, 140.8, 128.1, 119.1, 107.4, 84.0, 25.1, 24.8. HRMS calcd for [C₁₂H₁₆BBBr₂NO₂ + H]⁺ at 375.9714 found 375.9724. Elemental analysis calcd for C₁₂H₁₆BBBr₂NO₂: C, 38.24, H, 4.28, N, 3.72 found C, 38.68, H, 4.38, N, 3.68.

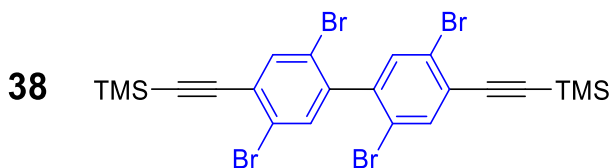


36: **20** (2.55 g, 6.76 mmol) and **35** (2.55 g, 6.76 mmol) are dissolved in DMSO (35 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. Pd(dppf) (247 mg, 0.34 mmol) and K₃PO₄ (4.3 g, 20.3 mmol) are added. The reaction mixture is stirred overnight at 110°C. Solvents are removed under reduced pressure and dissolve in AcOEt. The resulting mixture is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt. The resulting solution is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄, filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (PE/AcOEt/Et₃N: 75/20/5, solid deposition) to afford the desired compound as yellow oil (2.06 g, 61%). TLC: (PE/AcOEt/Et₃N: 75/20/5) R_f = 0.5. ¹H NMR (500 MHz,

CDCl₃): δ 7.19 (s, 2H), 6.95 (s, 2H), 4.12 (s, 4H). ¹³H NMR (126.3MHz, CDCl₃, ppm): δ 147.3, 135.3, 131.2, 124.4, 118.6, 107.1.

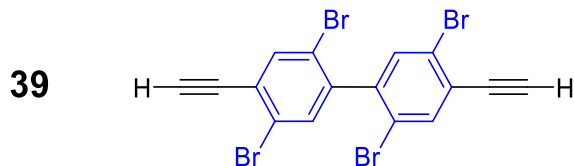


37: To solution of **36** (100 mg, 0.20 mmol) in acetic acid (5 mL) concentrated sulfuric acid (1 mL) is slowly added. The vial is putted in ice bath. A solution of NaNO₂ (30 mg, 0.40 mmol) in water (1 mL) is added drop by drop. The color of solution turn to range. After 1h of stirring at 0°C, a solution of KI (73 mg, 0.44 mmol) in water (1 mL) was slowly added at 0°C. The solution is stirred 1h at room temperature. Neutralization is achieved with saturated sodium carbonate solution. The solution is extracted three times with CH₂Cl₂ (50mL). The resulting organic phase is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄, filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (PE, solid deposition of the product pre-adsorbed on silica gel) to afford the desired compound as slightly yellow oil (74 mg, 51%). TLC: PE. R_f = 0.90. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, ppm): δ 8.12 (s, 2H), 7.43 (s, 2H). ¹³H NMR (126.3MHz, CDCl₃, ppm): δ 143.1, 141.3, 133.7, 128.8, 122.2, 102.1. HRMS calcd for [C₁₂H₄Br₄I₂ + H]⁺ at 717.5130 found 717.5153. Elemental analysis calcd for C₁₂H₄Br₄I₂: C, 19.97, H, 0.56 found C, 22.01, H, 0.60.

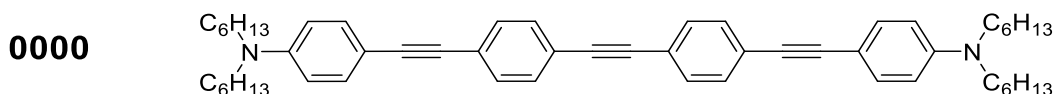


38: To solution of **37** (75 mg, 0.10 mmol) in 1:1. vol/vol dry THF/Et₃N (5 mL), extensively degassed by argon bubbling, PdCl₂(PPh₃)₂ (1 mg) CuI (0.5mg) and trimethylsilylacetylene (0.03 mL, 0.2 mmol) are added. The tube is sealed and the mixture is stirred overnight at room temperature. The resulting solution is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt. The resulting solution is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄ filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (PE) to afford the desired compound as yellow solid (69 mg, 100%). TLC: PE. R_f = 0.90. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, ppm)

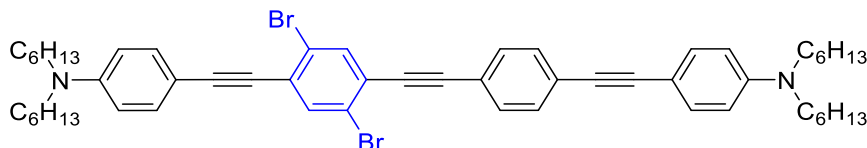
δ 7.74(s, 2H), 7.39 (s, 4H), 0.27 (s, 18H). ^{13}H NMR (126.3MHz, CDCl_3 , ppm): δ 141.6, 137.2, 134.2, 127.3, 124.5, 121.8, 102.5, 101.4, 0.00.



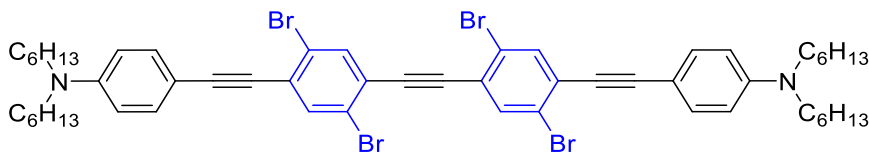
39: A molar solution of *TBAF* in THF (0.20 mL, 0.2 mmol) is added to a solution of **38** (60 mg, 0.09 mmol) in Et_2O (20mL). The mixture is stirred for 10 min at room temperature and then is filtered through a short pad of silica gel and eluted with Et_2O . The resulting solution is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na_2SO_4 filtered and solvents are removed under reduced pressure to afford the desired compound as yellow brown oil. Use directly without any characterization: the product seems very instable.



0000: **40** (100 mg, 0.21 mmol) and **2** (100 mg, 0.26 mmol) are dissolved in 1:5:2.5 vol/vol/vol THF/Toluene/ Et_3N (10 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (2 mg) and CuI (1 mg) are added. The reaction mixture is stirred overnight at room temperature during 12 hours. Solvents are removed under reduced pressure and the crude product is dissolved in AcOEt . The resulting mixture is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt . The resulting solution is washed one time with saturated NH_4Cl solution, three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na_2SO_4 , filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (PE/ CH_2Cl_2 : 10/1. solid deposition of the product pre-adsorbed on silica gel) to afford the desired compound as yellow brown oil (52 mg, 33%). TLC: (PE/ CH_2Cl_2 : 10/1) R_f = 0.3. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 7.46 (s, 8H), 7.35 (d, 4H), 6.56 (d, 4H), 3.26 (t, 8H), 1.57 (t, 8H), 1.32 (m, 24H), 0.90 (t, 12H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 148.4, 133.2, 131.7, 131.4, 124.6, 122.1, 111.4, 108.6, 93.5, 91.1, 87.3, 51.2, 31.9, 27.5, 27.1, 22.9, 14.3. HRMS calcd for $[\text{C}_{54}\text{H}_{68}\text{N}_2 + \text{H}]^+$ at 745.5455 found 745.5445. Elemental analysis calcd for $\text{C}_{54}\text{H}_{68}\text{N}_2 + \text{H}_2\text{O}$: C, 84.99, H, 9.25, N, 3.67 found C, 85.53, H, 9.09, N, 3.62.

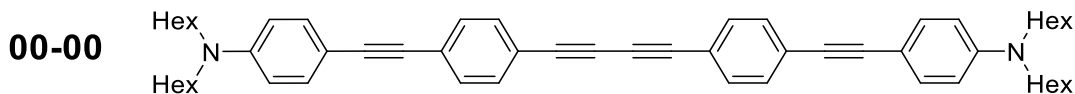
0200

0200: **9** (70 mg, 0.18 mmol) and **6** (140 mg, 0.22 mmol) are dissolved in 1:5:2.5 vol/vol/vol THF/Toluene/Et₃N (10 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. Pd(PPh₃)₂Cl₂ (1 mg) and CuI (2 mg) are added. The reaction mixture is stirred overnight at room temperature during 12 hours. Solvents are removed under reduced pressure and the crude product is dissolved in AcOEt. The resulting mixture is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt. The resulting solution is washed one time with saturated NH₄Cl solution, three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄, filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (PE/CH₂Cl₂: 10/1. solid deposition of the product pre-adsorbed on silica gel) to afford the desired compound as yellow brown oil (69 mg, 36 %). TLC: (PE / CH₂Cl₂: 10/1) R_f = 0.3. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.71 (d, 2H), 7.47 (m, 4H), 7.37 (m, 4H), 6.56 (d, 4H), 3.26 (t, 8H), 1.56 (m, 8H), 1.34 (m, 24H), 0.90 (t, 12H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 148.7, 148.3, 136.0, 135.5, 133.5, 133.1, 131.8, 131.3, 127.8, 125.3, 123.8, 123.4, 121.2, 111.5, 111.4, 108.4, 107.7, 99.6, 96.3, 93.9, 88.7, 87.3, 85.6, 51.2, 31.9, 27.4, 26.9, 22.9, 14.3. Elemental analysis calcd for C₅₄H₆₆Br₂N₂: C, 71.83, H, 7.37, N, 3.10 found C, 71.69, H, 7.43, N, 3.08.

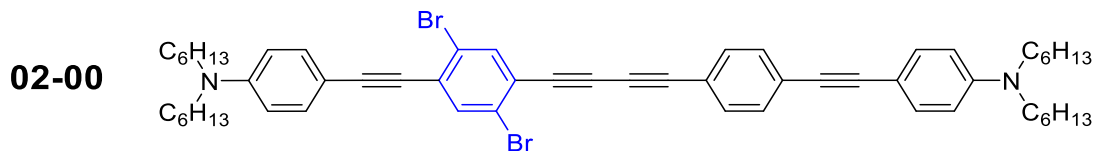
0220

0220: **10** (71 mg, 0.11 mmol) and **6** (60 mg, 0.11 mmol) are dissolved in 1:5:2.5 vol/vol/vol THF/Toluene/Et₃N (10 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. Pd(PPh₃)₂Cl₂ (1 mg) and CuI (0.5 mg) are added. The reaction mixture is stirred overnight at room temperature during 12 hours. Solvents are removed under reduced pressure and the crude product is dissolved in AcOEt. The resulting solution is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt. The resulting solution is washed one time with saturated NH₄Cl solution, three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄, filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (PE/CH₂Cl₂: 10/1. solid deposition of the product pre-adsorbed on silica gel) to afford the desired compound as yellow brown oil (29 mg, 25%). TLC: (PE/CH₂Cl₂: 10/1) R_f = 0.25. ¹H

NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 7.75 (s, 2H), 7.71 (s, 2H), 7.38 (d, 4H), 6.56 (d, 4H), 3.27 (t, 8H), 1.56 (m, 8H), 1.30 (m, 24H), 0.88 (t, 12H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 149.0, 136.6, 135.7, 133.6, 128.6, 124.6, 123.9, 123.5, 111.5, 107.7, 100.2, 93.5, 85.8, 51.3, 32.0, 27.5, 27.1, 23.0, 14.3.

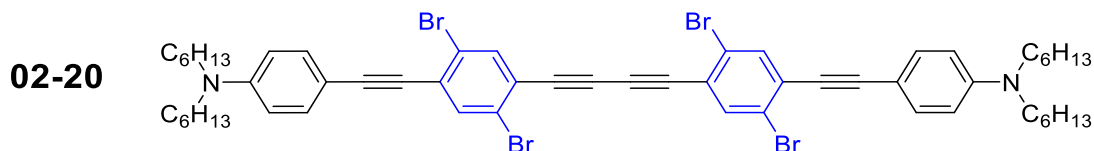


00-00: degassed by argon bubbling for 20 min. $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (1 mg) and CuI (3 mg) are **9** (64 mg, 0.17 mmol) is dissolved in 1:1 vol/vol THF/ Et_3N (10 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling. The reaction mixture is stirred overnight at room temperature during 12 hours. Solvents are removed under reduced pressure and the crude product is dissolved in AcOEt . The resulting mixture is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt . The resulting solution is washed one time with saturated NH_4Cl solution, three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na_2SO_4 , filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel ($\text{PE}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$: 10/2. solid deposition of the product pre-adsorbed on silica gel) to afford the desired compound as yellow brown oil (48 mg, 72%). TLC: ($\text{PE}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$: 10/2) R_f = 0.15. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 7.46 (s, 8H), 7.36 (d, 4H), 6.56 (d, 4H), 3.26 (t, 8H), 1.58 (m, 8H), 1.32 (m, 24H), 0.89 (t, 12H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 149. Elemental analysis calcd for $\text{C}_{56}\text{H}_{68}\text{N}_2 + \text{H}_2\text{O}$: C, 85.45, H, 8.96, N, 3.56 found C, 85.64, H, 8.62, N, 3.78.

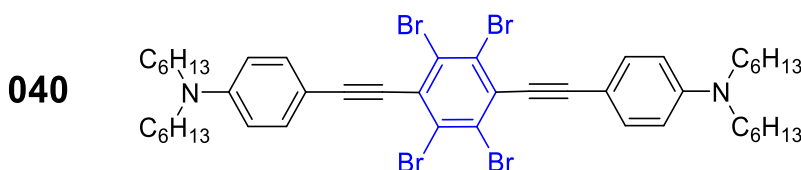


02-00: **10** (70 mg, 0.13 mmol) and **11** (62 mg, 0.13 mmol) are dissolved in 1:1 vol/vol THF/ Et_3N (10 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (2 mg) and CuI (0.5 mg) are added. The reaction mixture is stirred overnight at room temperature during 12 hours. Solvents are removed under reduced pressure and the crude product is dissolved in AcOEt . The resulting mixture is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt . The resulting solution is washed one time with saturated NH_4Cl solution, three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na_2SO_4 , filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel ($\text{PE}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$: 10/2. solid deposition of the product pre-adsorbed on silica gel) to afford the desired compound as yellow brown oil (25 mg, 23%). TLC: ($\text{PE}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$: 10/2) R_f = 0.30. ^1H NMR

(500 MHz, CDCl₃): δ 7.69 (m, 2H), 7.41 (m, 8H), 6.56 (d, 4H), 3.27 (t, 8H), 1.55 (m, 8H), 1.30 (m, 24H), 0.89 (t, 12H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 148.9, 148.5, 137.3, 135.6, 133.7, 133.6, 133.3, 132.7, 131.4, 128.9, 126.1, 124.5, 123.9, 123.4, 120.1, 111.5, 108.4, 107.6, 94.7, 87.3, 85.8, 84.7, 80.5, 51.3, 31.9, 27.5, 27.1, 22.9, 14.3. HRMS calcd for [C₅₆H₆₆Br₂N₂ + H]⁺ at 925.3665 found 925.3661. Elemental analysis calcd for C₅₆H₆₆Br₂N₂ + H₂O: C, 71.18, H, 7.25, N, 2.96 found C, 70.59, H, 7.15, N, 2.96.

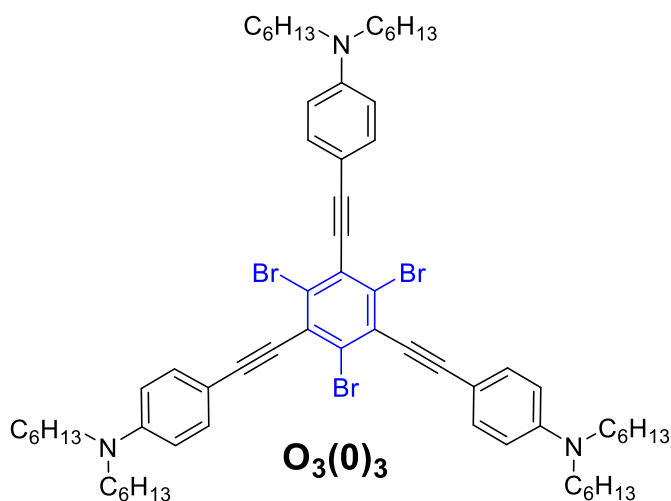


02-20: **10** (70 mg, 0.13 mmol) is dissolved in 1:1 vol/vol THF /Et₃N (10 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. Pd(PPh₃)₂Cl₂ (1 mg) and CuI (1 mg) are added. The reaction mixture is stirred overnight at room temperature during 12 hours. Solvents are removed under reduced pressure and the crude product is dissolved in AcOEt. The resulting mixture is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt. The resulting solution is washed one time with saturated NH₄Cl solution, three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄, filtered and solvents are removed under reduced pressure to afford the desired compound as yellow brown oil (70 mg, 100%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.73 (s, 2H), 7.67 (s, 2H), 7.37 (d, 4H), 6.55 (d, 4H), 3.27 (t, 8H), 1.57 (m, 8H), 1.31 (m, 24H), 0.88 (t, 12H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 148.9, 137.3, 135.5, 133.6, 129.2, 124.4, 123.4, 123.3, 111.4, 107.5, 100.9, 85.8, 81.4, 79.8, 51.2, 31.9, 27.4, 27.0, 22.9, 14.3. HRMS calcd for [C₅₆H₆₄Br₄N₂ + H]⁺ at 1081.1876 found 1081.1878. Elemental analysis calcd for C₅₆H₆₄Br₄N₂: C, 62.01, H, 5.95, N, 2.58 found C, 62.37, H, 5.99, N, 2.58.



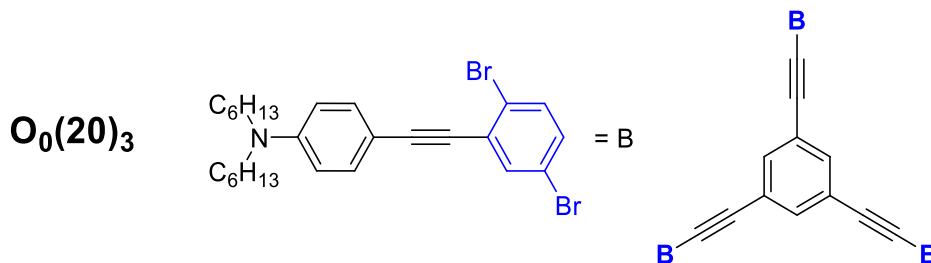
040: **4** (354 mg, 1.24 mmol) and **12** (400 mg, 0.62 mmol) are dissolved in Et₃N (8 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. Pd(PPh₃)₂Cl₂ (20 mg, 4.5%), PPh₃ (10mg, 6%) and CuI (8 mg, 5%) are added. The reaction mixture is stirred and heated in microwave at 80°C during 46 hours. Solvents are removed under reduced pressure and the crude product is dissolved in AcOEt. The resulting mixture is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt. The resulting solution is washed one time with saturated NH₄Cl solution, three times

with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na_2SO_4 , filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (PE/ CH_2Cl_2 /Toluene: 8/1/1. solid deposition of the product pre-adsorbed on silica gel) to afford the desired compound as yellow brown oil (184 mg, 31%). TLC: (PE/ CH_2Cl_2 /Toluene: 8/1/1) $R_f = 0.6$. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 8.02 (s, 2H), 7.42 (d, 4H), 6.56 (d, 4H), 3.27 (t, 8H), 1.56 (t, 8H), 1.30 (m, 24H), 0.89 (t, 12H). ^{13}C NMR (126.3MHz, CDCl_3 , ppm): δ 148.8, 133.4, 128.6, 126.7, 111.2, 111.1, 107.4, 103.1, 88.7, 51.0, 31.7, 27.2, 26.8, 14.1. HRMS calcd for $[\text{C}_{46}\text{H}_{60}\text{Br}_4\text{N}_2 + \text{H}]^+$ at 961.1 found 961.1. Elemental analysis calcd for $\text{C}_{46}\text{H}_{60}\text{Br}_4\text{N}_2$: C, 57.52, H, 6.30, N, 2.92 found C, 60.53, H, 6.93, N, 2.67.

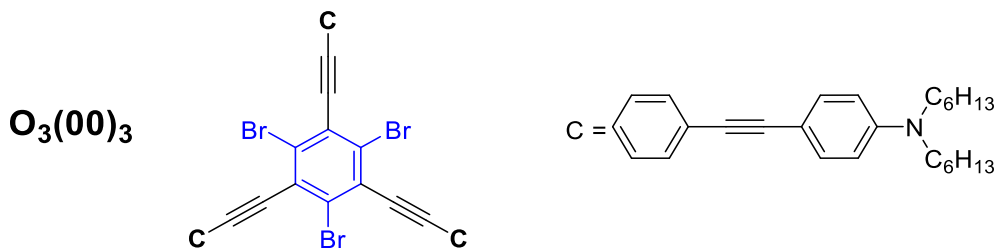


O₃(0)₃: **4** (371 mg, 1.3 mmol) and **13** (300 mg, 0.43 mmol) are dissolved in Et_3N (8 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (14 mg, 4.5%), PPh_3 (7 mg, 6%) and CuI (8 mg, 5%) are added. The reaction mixture is stirred and heated in microwave at 80°C during 24 hours. Solvents are removed under reduced pressure and the crude product is dissolved in AcOEt . The resulting mixture is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt . The resulting solution is washed one time with saturated NH_4Cl solution, three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na_2SO_4 , filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (PE/ CH_2Cl_2 : 9/1. solid deposition of the product pre-adsorbed on silica gel) to afford the desired compound as yellow brown oil (1.7g, 51%). TLC: (PE/ CH_2Cl_2 : 9/1) $R_f = 0.3$. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 7.46 (d, 6H), 6.58 (d, 6H), 3.28 (t, 12H), 1.58 (t, 12H), 1.31 (m, 36H), 0.90 (t, 18H). ^{13}C NMR (126.3MHz, CDCl_3 , ppm): δ 148.8, 133.4, 128.3, 125.8, 111.4, 108.0, 101.5, 87.1, 51.2, 31.9, 27.4, 27.0, 22.9, 14.3. HRMS calcd for $[\text{C}_{66}\text{H}_{90}\text{Br}_3\text{N}_3 + \text{H}]^+$ at 1162.4758 found

1162.4705. Elemental analysis calcd for $C_{66}H_{90}Br_3N_3$: C, 68.04, H, 7.79, N, 3.61 found C, 67.84, H, 7.72, N, 3.52.

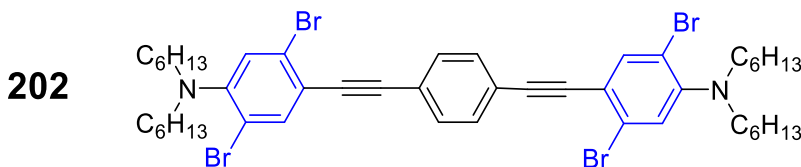


O₀(20)₃: **15** (150 mg, 1.00 mmol) and **6** (2.58 g, 4.00 mmol) are dissolved in Et₃N (40 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. Pd(PPh₃)₂Cl₂ (42 mg, 6%) and CuI (6 mg, 3%) are added. The reaction mixture is stirred overnight at room temperature during 12 hours. Solvents are removed under reduced pressure and the crude product is dissolved in AcOEt. The resulting mixture is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt. The resulting solution is washed one time with saturated NH₄Cl solution, three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄, filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (PE/CH₂Cl₂: 8/2. solid deposition of the product pre-adsorbed on silica gel) to afford the desired compound as yellow brown oil (250 mg, 14%). TLC: (PE/CH₂Cl₂: 8/2) R_f = 0.2. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.70 (s, 3H), 7.67 (s, 3H), 7.33 (d, 6H), 6.51 (d, 6H), 3.22 (t, 12H), 1.51 (t, 12H), 1.25 (m, 36H), 0.84 (t, 18H). ¹³C NMR (126.3 MHz, CDCl₃, ppm): δ 148.8, 136.3, 135.6, 134.9, 133.5, 128.4, 124.5, 124.0, 123.9, 123.8, 123.4, 111.4, 107.6, 100.0, 95.2, 85.6, 51.2, 31.9, 27.4, 27.0, 22.9, 14.2.

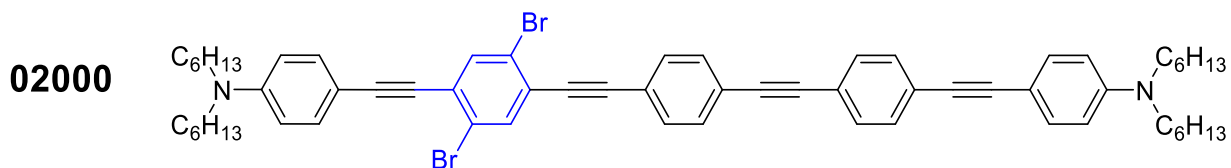


O₃(00)₃: **17** (150 mg, 0.10 mmol) and **29** (33 mg, 0.03 mmol) are dissolved in Et₃N/THF 8/5 vol/vol (13 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. Pd(PPh₃)₂Cl₂ (3.6 mg, 8%) and CuI (2 mg, 4%) are added. The reaction mixture is stirred overnight at room temperature during 12 hours. Solvents are removed under reduced pressure and the crude product is dissolved in AcOEt. The resulting mixture is filtered through a short pad of silica gel and eluted

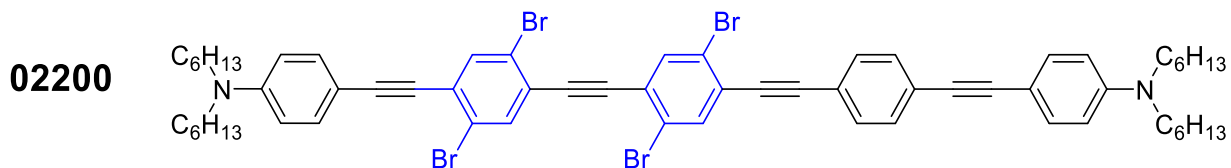
with AcOEt. The resulting solution is washed one time with saturated NH_4Cl solution, three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na_2SO_4 , filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (PE/ CH_2Cl_2 : 8/2. solid deposition of the product pre-adsorbed on silica gel). to afford the desired compound as yellow brown oil (1.7g, 51%). TLC: (PE/ CH_2Cl_2 : 8/2) R_f = 0.20. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 7.51 (d, 6H), 7.46 (d, 6H), 7.42 (d, 6H), 6.55 (d, 6H), 3.24 (t, 12H), 1.54 (t, 12H), 1.30 (m, 36H), 0.86 (t, 18H). ^{13}C NMR (126.3MHz, CDCl_3 , ppm): δ 148.4, 133.2, 131.9, 131.1, 128.2, 127.9, 125.7, 121.0, 111.4, 108.4, 99.8, 94.1, 89.3, 87.3, 51.2, 31.9, 27.4, 27.0, 22.9, 14.3. HRMS calcd for $[\text{C}_{90}\text{H}_{102}\text{Br}_3\text{N}_3 + 2\text{H}]^+$ at 731.7856 found 731.7885. Elemental analysis calcd for $\text{C}_{90}\text{H}_{102}\text{Br}_3\text{N}_3$: C, 73.76, H, 7.04, N, 2.87 found C, 74.01, H, 7.08, N, 2.86.



202: 23 (168 mg, 0.38 mmol) and *1,4-diiodobenzene* (60 mg, 0.19 mmol) are dissolved in $\text{Et}_3\text{N}/\text{THF}$ 1/1 vol/vol (10 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (11 mg, 4%) and CuI (5 mg, 3%) are added. The reaction mixture is stirred overnight at room temperature during 12 hours. Solvents are removed under reduced pressure and the crude product is dissolved in AcOEt. The resulting mixture is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt. The resulting solution is washed one time with saturated NH_4Cl solution, three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na_2SO_4 , filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (PE/ CH_2Cl_2 : 95/5. solid deposition of the product pre-adsorbed on silica gel). to afford the desired compound as yellow brown oil (120 mg, 34%). TLC: (PE/ CH_2Cl_2 : 95/5) R_f = 0.15. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 7.71 (s, 2H), 7.50 (s, 4H), 7.22 (s, 2H), 3.05 (t, 8H), 1.44 (m, 8H), 1.23 (m, 24H), 0.85 (t, 12H). ^{13}C NMR (126.3MHz, CDCl_3 , ppm): δ 151.1, 137.6, 131.6, 126.9, 124.5, 123.0, 119.9, 118.8, 93.2, 89.2, 52.7, 31.6, 26.9, 26.7, 22.7, 14.1. HRMS calcd for $[\text{C}_{46}\text{H}_{60}\text{Br}_4\text{N}_2 + \text{H}]^+$ at 957.1503 found 957.1500.

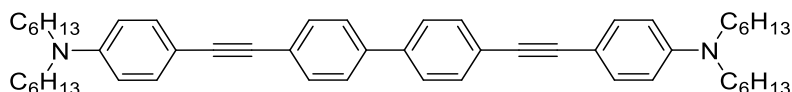


02000: **26** (154 mg, 0.28 mmol) and **30** (200 mg, 0.34 mmol) are dissolved in Et₃N (10 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. Pd(PPh₃)₂Cl₂ (5 mg, 2%) and CuI (2 mg, 4%) are added. The reaction mixture is stirred overnight at room temperature during 12 hours. Solvents are removed under reduced pressure and the crude product is dissolved in AcOEt. The resulting mixture is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt. The resulting solution is washed one time with saturated NH₄Cl solution, three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄, filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (PE / CH₂Cl₂: 9/1. solid deposition of the product pre-adsorbed on silica gel) to afford the desired compound as yellow brown oil (228 mg, 81%). TLC: (PE / CH₂Cl₂: 9/1) R_f = 0.3. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃. ppm): δ 7.75 (s, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.53 (m, 4H), 7.46 (m, 4H), 7.42 (d, 2H), 7.37 (d, 2H), 6.58 (d, 4H), 3.28 (m, 8H), 1.59 (m, 8H), 1.33 (m, 24H), 0.92 (t, 12H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃. ppm): δ 148.7, 148.2, 136.0, 135.4, 133.4, 133.1, 131.8, 131.7, 131.6, 131.2, 127.9, 124.9, 124.8, 123.9, 123.8, 123.3, 122.4, 121.7, 111.3, 108.4, 107.6, 99.7, 95.8, 93.5, 91.9, 90.6, 89.1, 87.2, 85.6, 51.1, 31.8, 27.3, 26.9, 22.8, 14.2. HRMS (MALDI) m/z, calcd for [M+H]⁺: 1001.3979, found 1001.3976. Elemental analysis calcd for C₆₂H₇₀Br₂N₂: C, 74.24, H, 7.03, N 2.79 found C, 74.33, H, 7.04, N 2.77.

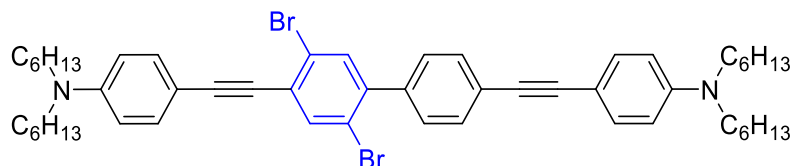


02200: **28** (335 mg, 0.42 mmol) and **29** (300 mg, 0.63 mmol) are dissolved in Et₃N/THF 1/1 vol/vol (30 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. Pd(PPh₃)₂Cl₂ (30 mg, 10%) and CuI (12 mg, 4%) are added. The reaction mixture is stirred overnight at room temperature during 12 hours. Solvents are removed under reduced pressure and the crude product is dissolved in AcOEt. The resulting mixture is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt. The resulting solution is washed one time with saturated NH₄Cl solution, three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄, filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (PE/CH₂Cl₂: 9/1. solid deposition of the product pre-adsorbed on silica gel) to afford the desired compound as yellow brown oil (1.7g, 51%). TLC: (PE/CH₂Cl₂: 9/1) R_f = 0.25. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.65 (s + d, 3H), 7.60 (s, 1H), 7.38 (m, 4H), 7.29 (m, 4H), 6.47 (m, 4H), 3.18 (t, 8H),

1.49 (t, 8H), 1.23 (m, 14H), 0.82 (t, 12H). ^{13}H NMR (126.3MHz, CDCl_3 , ppm): δ 147.5, 147.1, 135.3, 135.2, 135.0, 134.3, 132.3, 132.0, 130.6, 130.1, 127.4, 125.9, 124.6, 124.3, 123.0, 122.6, 122.1, 119.7, 110.1, 110.0, 107.2, 106.3, 99.1, 96.2, 92.9, 92.8, 91.8, 87.2, 86.2, 84.5, 50.0, 30.6, 26.1, 25.8, 21.1, 19.0. HRMS calcd for $[\text{C}_{62}\text{H}_{69}\text{Br}_4\text{N}_2 + \text{H}]^+$ at 1157.2189 found 1157.2136. Elemental analysis calcd for $\text{C}_{62}\text{H}_{69}\text{Br}_4\text{N}_2$: C, 64.15, H, 5.90, N, 2.41 found C, 63.92, H, 5.85, N, 2.25.

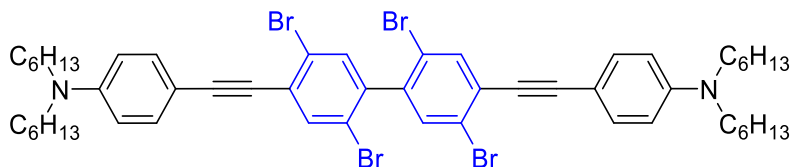
00/00

00/00: 31 (90 mg, 0.19 mmol) and **11** (135 mg, 0.28 mmol) are dissolved in 9:1:1 vol/vol/vol Toluene/EtOH/ H_2O (6.5 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (7.1 mg, 3%). The reaction mixture was stirred overnight at 85°C during 12 hours. Solvents are removed under reduced pressure and the crude product is dissolved in AcOEt. The resulting solution is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt. The resulting solution is washed one time with saturated NH_4Cl solution, three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na_2SO_4 , filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (PE / CH_2Cl_2 : 85/15. solid deposition of the product pre-adsorbed on silica gel) to afford the desired compound as yellow brown oil (1.7g, 51%). TLC: (PE / CH_2Cl_2 : 85/15) R_f = 0.4. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 7.54 (s, 8H), 7.35 (d, 4H), 6.55 (d, 4H), 3.26 (t, 8H), 1.56 (m, 8H), 1.30 (m, 24H), 0.88 (t, 12H). ^{13}H NMR (126.3MHz, CDCl_3 , ppm): δ 148.0, 139.2, 132.9, 131.7, 126.7, 123.5, 111.2, 108.7, 91.9, 87.1, 51.0, 31.7, 27.2, 26.8, 22.7, 14.1. HRMS calcd for $[\text{C}_{52}\text{H}_{68}\text{N}_2 + \text{H}]^+$ at 721.5455 found 721.5447.

02/00

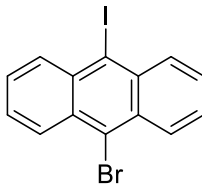
02/00: 34 (107 mg, 0.30 mmol) and **2** (345 mg, 0.89 mmol) are dissolved in Et_3N (15 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (100 mg) and CuI (3 mg) are added. The reaction mixture was stirred overnight at 85°C during 12 hours. Solvents are removed under reduced pressure and the crude product is dissolved in AcOEt. The resulting mixture is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt. The resulting solution is washed one time with saturated NH_4Cl solution, three times with water and pre-dried by washing

with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄, filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (PE/CH₂Cl₂: 9/1. solid deposition of the product pre-adsorbed on silica gel) to afford the desired compound as yellow brown oil (185 mg, 71%). TLC: (PE/CH₂Cl₂: 85/15) R_f = 0.45. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.78 (s, 1H), 7.53 (s+d, 3H), 7.38 (m, 6H), 6.57 (d, 4H), 3.27 (t, 8H), 1.57 (t, 8H), 1.325 (m, 24H), 0.90 (t, 12H). ¹³H NMR (126.3MHz, CDCl₃. ppm): δ 148.5, 148.1, 141.9, 138.2, 136.4, 134.2, 133.3, 133.0, 129.2, 127.1, 124.3, 123.9, 120.6, 111.2(2), 108.5, 107.7, 97.7, 92.1, 86.9, 85.5, 50.0, 30.6, 26.1, 25.8, 21.1, 19.0.. HRMS calcd for [C₅₂H₆₆Br₂N₂ + H]⁺ at 877.3666 found 877.3623. Elemental analysis calcd for C₅₂H₆₆Br₂N₂: C, 71.06, H, 7.57, N, 3.19 found C, 71.08, H, 7.47, N, 3.02.

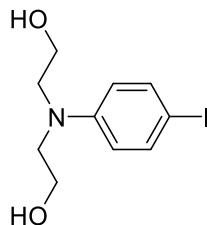
02/20

02/00: 39 (50 mg, 0.10 mmol) and **2** (120 mg, 0.3 mmol) are dissolved in Et₃N (15 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. Pd(PPh₃)₂Cl₂ (50 mg) and CuI (2 mg) are added. The reaction mixture is stirred overnight at 85°C during 12 hours. Solvents are removed under reduced pressure and the crude product is dissolved in AcOEt. The resulting mixture is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt. The resulting solution is washed one time with saturated NH₄Cl solution, three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄, filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (PE/CH₂Cl₂: 9/1. solid deposition of the product pre-adsorbed on silica gel) to afford the desired compound as yellow brown oil (75 mg, 72%). TLC: (PE/CH₂Cl₂: 9/1) R_f = 0.5. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.77 (s, 2H), 7.43 (s, 2H), 7.40 (d, 4H), 6.57 (d, 4H), 3.27 (t, 8H), 1.56 (t, 8H), 1.31 (m, 24H), 0.89 (t, 12H). ¹³H NMR (126.3MHz, CDCl₃. ppm): δ 148.6, 140.2, 135.8, 134.0, 133.3, 128.2, 123.6, 121.7, 111.2, 107.6, 98.2, 84.9, 51.0, 31.8, 27.2, 26.8, 22.7, 14.1. HRMS calcd for [C₅₂H₆₄Br₄N₂ + H]⁺ at 1033.1835 found 1033.1876. Elemental analysis calcd for C₅₂H₆₄Br₄N₂: C, 60.25, H, 6.22, N, 2.70 found C, 59.95, H, 6.13, N, 2.48.

I.1.c) Chromophore for imaging

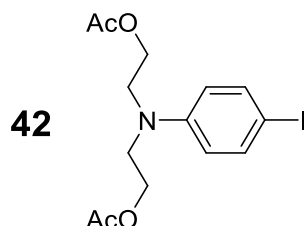
40

40: 1-Iodo-8-bromoanthracene : To a cooled (-70°C) solution of *1,8-dibromoanthracene* (9.2g, 27.4mmol) in THF (200mL) are added dropwise 12mL of a 2.5M *n-BuLi* solution in hexane (30.1mmol, 1.1 eq.). After the end of the addition, the mixture is stirred for 2 hours at -70°C , then a solution of iodine (9g, 35.6 mmol, 1.3 eq) in THF (40mL) is added dropwise. The mixture is stirred for 12h at room temperature. After solvent evaporation under reduced pressure, the resulting yellow solid is collected by filtration, washed two times with water and two times with a 10% sodium thiosulfate solution. The product is recrystallized from toluene to provide the desired product as yellow needles (76%). mp: 118°C . TLC (CH_2Cl_2 Rf = 0.9). ^1H NMR (500MHz, CDCl_3 , ppm): δ 8.54 (m, 4H), 7.59 (m, 4H). ^{13}C NMR (126.3MHz, CDCl_3 , ppm): δ 134.27, 134.11, 130.98, 128.59, 128, 127.51, 125.53, 106.45. HRMS calcd for $[\text{C}_{14}\text{H}_8\text{BrI} + \text{H}]^+$ at 382.8927 found 382.8922. Elemental analysis calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{BrI}$ C, 43.90, H, 2.11 found C, 44.11, H, 2.11.

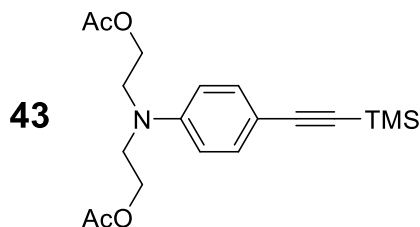
41

41: N,N-di(2-hydroxyethyl)-4-iodoaniline: To a solution of *N,N-diethanol-aniline* (10g, 55.3mmol), in a 1:1. vol/vol dioxane/pyridine mixture (480mL) cooled in an ice bath, is added iodine (40g, 156.4mmol, 2.8 eq.). The resulting purple solution is stirred one hour at 0°C then allowed to warm-up to room temperature over 1 hour. Excess iodine is quenched by addition of an excess of sodium thiosulfate and solvent is evaporated. The product is dissolved in ethyl acetate, salts are filtered off and the filtrate washed two times with water. 300mL of 1M chlorhydric acid are added, and the aqueous phase, which contains the protonated product, is extracted. Neutralization of this extracted aqueous phase by addition of 4M NaOH leads to precipitation of the product, which is filtered and extensively dried to afford a white solid (67%). mp : $77-78^{\circ}\text{C}$. ^1H NMR (500MHz, CDCl_3 , ppm): δ 7.50 (d, 2H), 6.52 (d, 2H), 3.85 (t, 4H), 3.58 (t, 4H), 3.44(br, 2H). ^{13}C NMR (126.3MHz, CDCl_3 , ppm): δ 147.4, 107.0, 141.93 (br : 2 peaks), 60.6, 55.2. HRMS calcd for

$[\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{INO}_2 + \text{H}]^+$ at 308.0142 found 308.0153. Elemental analysis calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{INO}_2$. 39.11, H, 4.59, N, 4.56 found C, 39.98, H, 4.62, N, 4.58

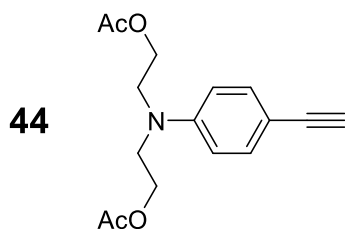


42: 4-iodo-N,N-diethoxyacetylaniline: Acetic anhydride (10.85g, 106.3mmol, 5.1 eq.) is added to a solution of **41** (6.4g, 20.8mmol), in pyridine (10mL) and the resulting solution is refluxed for 48h. The reaction is quenched by addition of a dilute aqueous hydrochloric acid solution (0.05M, 100mL). After filtration on Buchner (washed in Et₂O), the filtrate is extracted three times with Et₂O. The organic phase is neutralized, washed four times with water, pre-dried by washing with a sodium chloride solution and extracted. The organic phase is dried with Na₂SO₄, filtered and solvents are removed under reduced pressure. A yellowish oil is obtained in 97% yield. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, ppm): δ 7.49 (d, 2H), 6.57 (d, 2H), 4.24 (t, 4H), 3.62 (t, 4H), 2.08 (s, 6H) ¹³H NMR (126.3MHz, CDCl₃, ppm): δ 170.93, 146.90, 137.99, 114.39, 61.61, 49.66, 20.92. HRMS calcd for $[\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{INO}_4 + \text{H}]^+$ at 392.0353 found 392.0354. Elemental analysis calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{INO}_4$. 42.98, H, 4.64, N, 3.58 found C, 43.25, H, 4.77, N, 3.66.

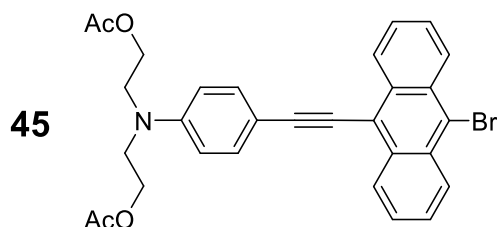


43: 4-triméthylsilyl-1-éthynyl-N,N-diéthoxyacétylaniline: **42** (7.6g, 19.4mmol), is dissolved in 1:1. vol/vol THF/Et₃N (120 mL) and the solution is extensively degassed by argon bubbling. PdCl₂(PPh₃)₂CuI (175mg, 0.19mmol, 0.01eq), CuI (88mg, 0.57 mmol, 0.03 eq.) and 3,6mL of trimethylsilylacetylene (25,2mmol, 1,3eq) are added, and the tube is sealed. The mixture is stirred overnight at room temperature. After filtration of the reaction mixture on a short pad of silica gel, and elution with AcOEt, the resulting filtrate is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄ filtered and solvents are removed under reduced pressure to afford the desired compound as yellow oil (99%). TLC: CH₂Cl₂. R_f = 0.4. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, ppm): δ 7.32(d, 2H), 6.63 (d, 2H), 4.22 (t, 4H),

3.62 (t, 4H), 2.05 (s, 6H), 0.24 (s, 9H). ^{13}H NMR (126.3MHz, CDCl_3 , ppm): δ 170.74, 147.07, 133.26, 111.27, 110.73, 105.80, 91.48, 87.80, 85.79, 61.06, 49.30, 20.70, 0.01. HRMS calcd for $[\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{NO}_4\text{Si} + \text{H}]^+$ at 362.1782 found 362.1783. Elemental analysis calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{NO}_4\text{Si}$: C, 63.13, H, 7.53, N, 3.87 found C, 63.28, H, 7.60, N, 3.90.

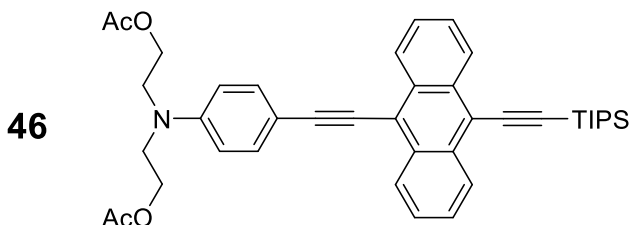


44: 4-ethynyl-N,N-diethoxyacetyl-aniline (**3**): A molar solution of TBAF in THF (14.4mL, 14.4 mmol, 1.2 eq.) is added to a solution of **43** (3.5g, 12mmol) in Et_2O (10mL). The mixture is stirred for 10 min at room temperature and the solution is filtered through a short pad of silica gel and eluted with Et_2O . The resulting solution is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na_2SO_4 filtered and solvents are removed under reduced pressure to afford the desired compound as yellow brown oil (97%). TLC: CH_2Cl_2 . R_f = 0.35. ^1H NMR (500MHz, CDCl_3 , ppm): δ 7.30 (d, 2H), 6.68 (d, 2H), 4.25 (t, 3H), 3.65 (t, 3H), 2.99 (s, 1H), 2.06 (s, 6H).

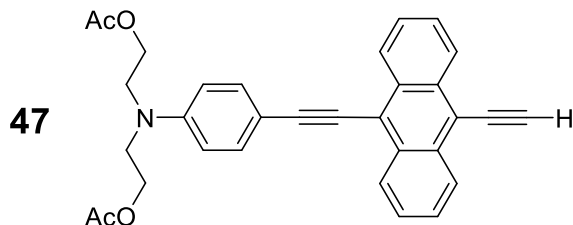


45: **44** (3.5g, 12.1mmol) and **40** (5.09g, 13.3mmol, 1.1 eq.) are dissolved in 1:1 vol/vol Toluene/ Et_3N (200 mL). The solution is degassed by argon bubbling (20 min). $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (100mg, 0.12mmol, 0.01eq.) and CuI (45mg, 0.36mmol, 0.03eq.) are added and the tube is sealed. The mixture is stirred overnight at 80°C . The mixture is filtered through a short pad of silica gel, eluted with AcOEt . The resulting solution is washed three times with water dried on sodium sulfate filtered and solvents are removed at reduced pressure. Purification by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2 , solid deposition of the compound pre-adsorbed on silica) afforded the desired compound as a yellow solid with a blue glow (73%). TLC: CH_2Cl_2 . R_f = 0.5. ^1H NMR (500MHz, CDCl_3 , ppm): δ 8.76 (dd, 2H), 8.61 (dd, 2H), 7.68 (m, 6H), 6.87 (d 2H), 4.35 (t, 4H), 3.75 (t, 4H), 2.13 (s, 6H). ^{13}H NMR (126.3MHz, CDCl_3 , ppm): δ 170.97, 147.54, 133.18, 132.75, 130.35,

128.17, 127.51, 127.41, 126.52, 123.08, 119.28, 11.88, 111.11, 103.01, 84.52, 61.25, 49.65, 20.95. HRMS calcd for $[C_{30}H_{26}BrNO_4 + H]^+$ at 544.1118 found 544.1094. Elemental analysis calcd for $C_{30}H_{26}BrNO_4$: C, 66.18, H, 4.81, N, 2.57 found C, 65.81, H, 4.79, N, 1.93.

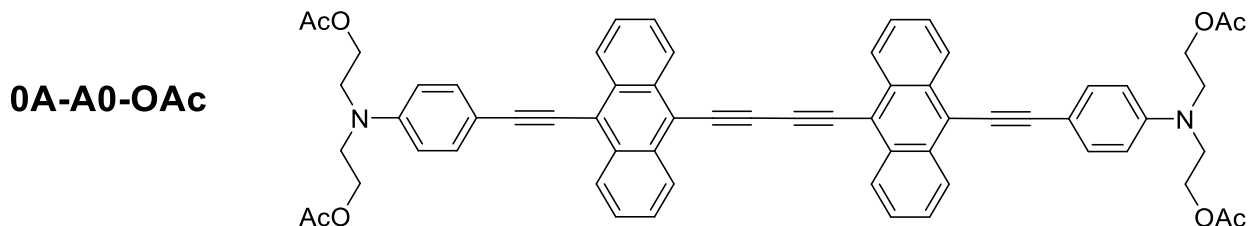


46: To solution of **45** (1.5g, 2.76mmol) in 1:1. vol/vol Toluene/ Et_3N (32 mL), extensively degassed by argon bubbling, $PdCl_2(PPh_3)_2$ (100mg, 0.028 mmol, 0.01 eq.) CuI (45mg, 0.083mmol, 0.03eq.) and *triisopropylsilylacetylene* (0.8mL, 3.59mmol, 1.3 eq.) are added. The tube is sealed and the mixture is stirred overnight at $85^\circ C$. The resulting mixture is filtered through a short pad of silica gel and eluted with $AcOEt$. The resulting solution is washed three times with water and and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na_2SO_4 filtered and solvents are removed under reduced pressure to afford the desired compound as yellow oil (99%). TLC: CH_2Cl_2 R_f = 0.3. 1H NMR (500MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 8.6-8.8 dd 4H, 7.64 m, 6H, 6.84 (d, 2H), 4.31 (t, 3H), 3.71 (t, 3H), 2.1 (s, 6H), 1.30 (s, 21H). ^{13}H NMR (126.3MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 170.9, 147.5, 133.2, 132.6, 131.7, 127.5, 127.255, 126.8, 126.4, 119.6, 117.7, 111.9, 111.2, 104.3, 103.7, 103.6, 85.1, 61.2, 49.6, 20.9, 18.9, 11.6. HRMS calcd for $[C_{41}H_{47}NO_4Si + H]^+$ at 646.3347 found 646.3325. Elemental analysis calcd for $C_{41}H_{47}NO_4Si$: C, 76.24, H, 7.33, N, 2.17 found C, 76.33, H, 7.35, N, 2.13.

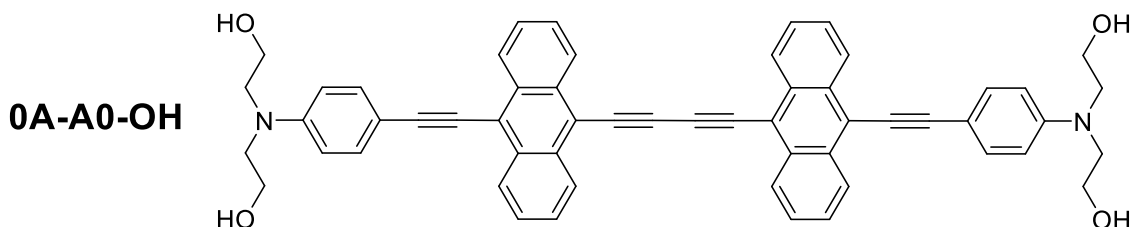


47: A molar solution of *TBAF* in *THF* (2.7mL, 2.7mmol) is added to a solution of **46** (1.16g, 1.8mmol) dissolved in Et_2O (10mL). After 10 minutes stirring at room temperature, the reaction mixture is filtered on a short pad of silica gel and eluted with Et_2O . The resulting solution is washed three times with water and and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na_2SO_4 filtered and solvents are removed under reduced pressure to afford the desired compound as dark-yellowish oil (96%). 1H NMR (500MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 8.72-8.61

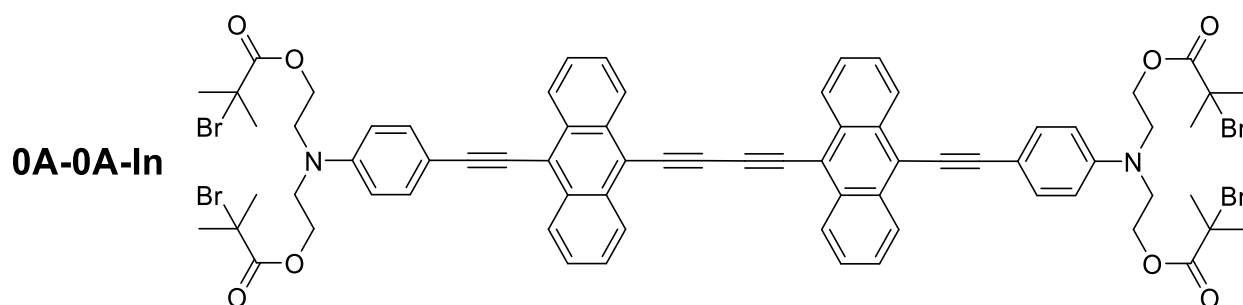
(dd, 4H), 7.64 (m, 6H), 6.84 (d, 2H), 4.31 (t, 3H), 4.08 (s, 1H), 3.72 (t, 3H), 2.10 (s, 6H). The product is directly involved in the next step without additional characterization.



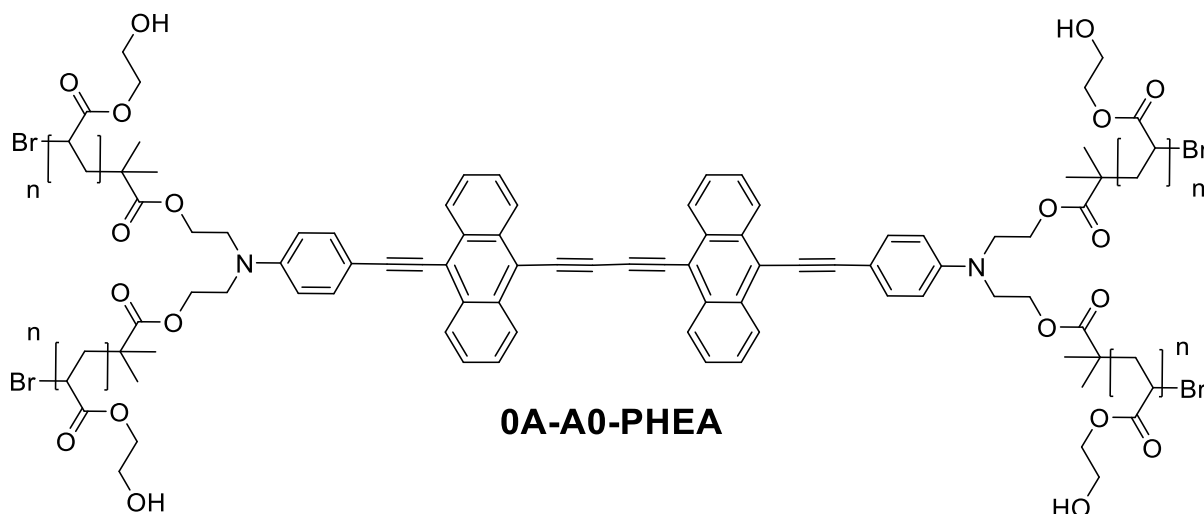
0A-A0-OAc: To a solution of **47** (600 mg, 1.22 mmol), in THF/Et₃N mixture, is added CuI (7mg, 0.037mmol, 0.03eq.). The solution is exposed to air and stirred overnight at room temperature. After solvent evaporation under reduced pressure, the product is purified on silica gel (CH₂Cl₂/AcOEt: 9/1. solid deposition of the product pre-adsorbed on silica gel). A dark-purple solid is obtained with 80% yield. TLC: CH₂Cl₂/AcOEt 9/1 R_f = 0.6. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, ppm): δ 8.65 (m, 8H), 7.61 (m, 12H), 6.77 (d, 2H), 4.24 (t, 8H), 3.65 (t, 8H), 2.02 (s, 12H). ¹³H NMR (126.3MHz, CDCl₃, ppm): δ 170.99, 147.7, 133.6, 133.4, 131.7, 127.7, 127.5, 127.1, 126.7, 120.9, 115.7, 111.9, 110.9, 104.8, 86.5, 85.3, 82.9, 61.3, 49.6, 30.9 (acetone), 20.9. HRMS calcd for [C₆₄H₅₂N₂O₈ + H]⁺ at 977.3796 found 977.3765. Elemental analysis calcd for C₆₄H₅₂N₂O₈+H₂O: C, 77.25, H, 5.47, N, 2.82 found at C, 77.13, H, 5.45, N, 2.81.



0A-A0-OH: To a solution of **0A-A0-OAc** (400mg, 0.41mmol), in 1:1. THF/MeOH (5mL/5mL), is added K₂CO₃ (452 mg, 3.3 mmol). After one night, some MeOH is added. The precipating product is filtered on Wheaton filtration support (DURAPORE® membrane filter 0.45µm gridded). The resulting solid is extensively washed with MeOH and water. The desired compound is obtained as a dark-purple solid with 95% yield. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, ppm): δ 8.69 (dd, 8H), 7.85 (m, 8H), 7.70 (d, 4H), 6.86 (d, 4H), 4.86 (t, 4H), 3.63 (t, 8H), 3.55 (t, 8H). ¹³H NMR (126.3MHz, CDCl₃, ppm): δ 148.9, 139.2, 133.2, 132.6, 130.5, 128.5, 127.5, 126.4, 124.9, 120.9, 113.6, 111.5, 107.0, 86.1, 84.6, 82.9, 58.1, 53.1. HRMS calcd for [C₅₆H₄₄N₂O₄ + H]⁺ at 809.3374 found 809.3335. Elemental analysis calcd for C₅₆H₄₄N₂O₄ + H₂O: C, 81.33, H, 5.61, N, 3.39 found at C, 81.86, H, 6.00, N, 2.85.

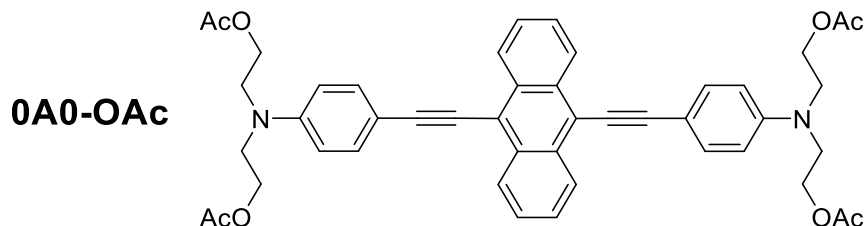


0A-A0-In: To a solution of **0A-A0-OH** (250 mg, 0.3 mmol), in dry CH_2Cl_2 at 0°C , is added dropwise *bromoisobutyrylbromide* (190 μL , 1.5 mmol). After 4 hours, MeOH is added and product is purified by silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 9/1). TLC : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 9/1 $R_f = 0.6$. ^1H NMR (500MHz, CDCl_3 , ppm): δ 8.69 (dd, 8H), 7.66 (m, 8H), 6.84 (d, 4H), 4.40 (t, 8H), 3.79 (t, 8H), 1.92 (s, 24H). ^{13}C NMR (126.3MHz, CDCl_3 , ppm): δ 171.9, 147.7, 133.8, 133.6, 131.9, 127.9, 127.7, 127.3, 126.9, 121.1, 116.0, 112.4, 111.5, 104.9, 86.7, 85.5, 83.2, 63.2, 55.7, 49.4, 31.1, 30.9. HRMS calcd for $[\text{C}_{72}\text{H}_{64}\text{Br}_4\text{B}_2\text{O}_8 + \text{H}]^+$ at 1401.1469 found 1401.1410. Elemental analysis calcd for $\text{C}_{72}\text{H}_{64}\text{Br}_4\text{B}_2\text{O}_8$: C, 61.55, H, 4.59, N, 1.99 found at C, 61.63, H, 5.39, N, 1.60.

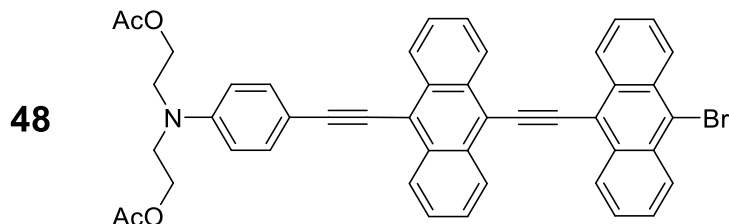


0A-A0-PHEA: **0A-A0-In** (0.2g, 0.14mmol), 2,2'-bipyridine ligand (0.1786g, 1.90mmol) and CuBr (Cu, 0.082g, 0.57mmol), are dissolved in a mixture of THF (8mL) and HEA monomer (8mL, 61.6 mmol). Polymerization of the resulting solution is initiated by stirring the mixture at 85°C . After 20 minutes, reaction is stopped by freezing and adding water. The resulting mixture is transferred into a dialysis membrane (spectra/por membrane, MWCO=1000), and dialyzed against a large volume of deionized water. The external water is regularly replaced at 6H or 12H intervals with fresh water during dialysis (3 days). Finally, the dialysis bag content is filtered and lyophilized to yield 510mg of a dark reddish polymer ^1H NMR (500MHz, CDCl_3 , ppm): δ 8.46 (m, 8H), 7.51

(m, 12H), 6.78 (m, 4H), 4.05 (b, 114H), 3.64 (b, 117H), 2.34 (b, 50H), 1.88-1.56 (b, 103H), 1.05 (b, 24H). $n = 12-14$ (NMR) $M = 4800$ g/mol (NMR), $M_n = 15000$ g/mol (GPC), $M_w/M_n = 1.5$ (GPC).

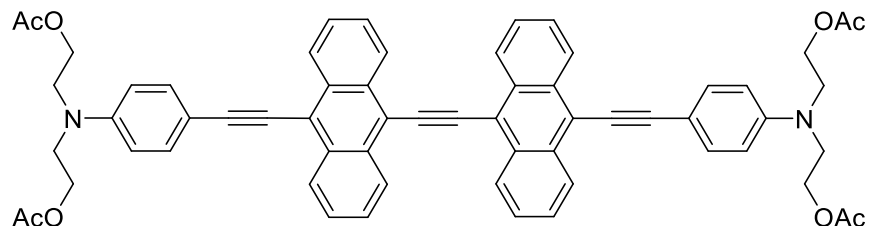


0A0-OAc: 44 (9.2 g, 22.5 mmol) and **40** (4.5 g, 13.4 mmol) are dissolved in 1:1 vol/vol toluene/ Et_3N (400 mL). The solution is degassed by argon bubbling (20 min). $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (200 mg, 0.28 mmol) and CuI (55 mg, 0.28 mmol) are added. The mixture is stirred overnight at 80°C in sealed tube. The mixture is filtered through a short pad of silica gel, eluted with AcOEt . The resulting solution was washed three times with water dried on sodium sulfate filtered and solvents were removed at reduced pressure. Purification by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2 then $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{THF}$ 9/1, solid deposition of the compound pre-adsorbed on silica) afforded the desired compound as a yellow oil (5.9 g, 58%). TLC: CH_2Cl_2 . $R_f = 0.3$. ^1H NMR (500MHz, CDCl_3 , ppm): δ 8.66 (m, 4H), 7.59 (m, 6H), 6.80 (d, 4H), 4.27 (t, 8H), 3.68 (t, 8H), 2.03 (s, 12H). ^{13}C NMR (126.3MHz, CDCl_3 , ppm): δ 170.9, 147.5, 133.2, 131.9, 127.4, 126.5, 118.5, 111.9, 111.4, 103.3, 85.3, 61.3, 49.6, 20.9.

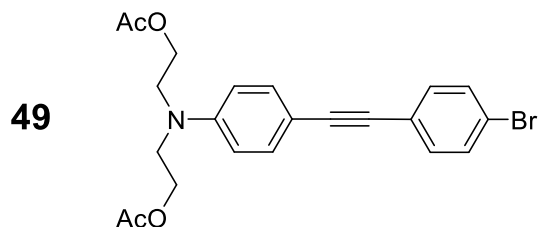


48: 47 (1.73 g, 1.53 mmol) and **40** (1.23 g, 3.21 mmol) are dissolved in 1:1 vol/vol Toluene/ Et_3N (20 mL). The solution is degassed by argon bubbling (20 min). $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (45 mg, 0.06 mmol) and CuI (24 mg, 0.13 mmol) are added and the tube is sealed. The mixture is stirred overnight at 85°C . The mixture is filtered through a short pad of silica gel, eluted with AcOEt . The resulting solution was washed three times with water dried on sodium sulfate filtered and solvents were removed at reduced pressure. Purification by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2 , solid deposition of the compound pre-adsorbed on silica) afforded the desired compound as a yellow solid with a blue glow (1.75 g, 73%). TLC: CH_2Cl_2 . $R_f = 0.4$. ^1H NMR (500MHz, CDCl_3 , ppm): δ 8.91 (dd, 2H), 8.86 (dd, 2H), 8.71 (dd, 2H), 8.58 (dd, 2H), 7.64 (m, 10H), 6.80 (d 2H), 4.29 (t, 4H), 3.69 (t, 4H), 2.07 (s, 6H). ^{13}C NMR (126.3MHz, CDCl_3 , ppm): δ 170.97, 147.60, 133.30, 133.15,

132.37, 131.84, 130.42, 128.42, 127.69, 127.51, 127.42, 127.19, 127.18, 127.15, 126.54, 124.55, 120.18, 118.60, 117.29, 111.89, 111.17, 104.21, 99.08, 98.38, 85.28, 61.27, 49.64, 20.95.

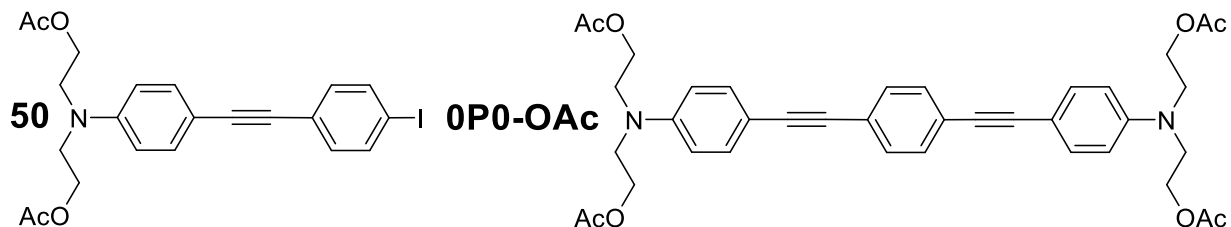


0AA0-OAc: 48 (1.00 g, 1.34 mmol) and **44** (466 mg, 1.61 mmol) are dissolved in 1:1 vol/vol Toluene/Et₃N (20 mL). The solution is degassed by argon bubbling (20 min). PdCl₂(PPh₃)₂ (19 mg, 0.03 mmol) and CuI (10 mg, 0.06 mmol) are added and the tube is sealed. The mixture is stirred overnight at 85°C. The mixture is filtered through a short pad of silica gel, eluted with AcOEt. The resulting solution was washed three times with water dried on sodium sulfate filtered and solvents were removed at reduced pressure. Purification by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/AcOEt: 9/1, solid deposition of the compound pre-adsorbed on silica) afforded a mixture the desired compound and the homocoupling product. The desired compound was isolated from the side product upon precipitation in pentane as a red solid (549 mg, 43%). TLC: CH₂Cl₂/AcOEt: 9/1. R_f = 0.6. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, ppm): δ 8.93 (dd, 4H), 8.74 (dd, 4H), 7.68 (m, 12H), 6.82 (d, 4H), 4.29 (t, 8H), 3.70 (t, 8H), 2.07 (s, 12H). ¹³H NMR (126.3MHz, CDCl₃, ppm): δ 171.16, 147.79, 133.50, 132.64, 132.14, 127.88, 127.57, 127.34, 126.79, 120.18, 117.87, 112.10, 111.38, 104.31, 99.49, 85.50, 61.46, 49.84, 21.14.



49: 44 (3.61 g, 12.47mmol) and *1-iodo-4-bromo-benzene* (3.20 g, 13.3mmol) are dissolved in 1:1 vol/vol THF/Et₃N (200 mL). The solution is degassed by argon bubbling (20 min). PdCl₂(PPh₃)₂ (100mg, 0.12mmol) and CuI (45mg, 0.36mmol) are added. The mixture is stirred overnight at room temperature. The mixture is filtered through a short pad of silica gel, eluted with AcOEt. The resulting solution is washed three times with water dried on sodium sulfate filtered and solvents are removed at reduced pressure. Purification by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂ then CH₂Cl₂/EtOAc 98/2, solid deposition of the compound pre-adsorbed on silica) affords the

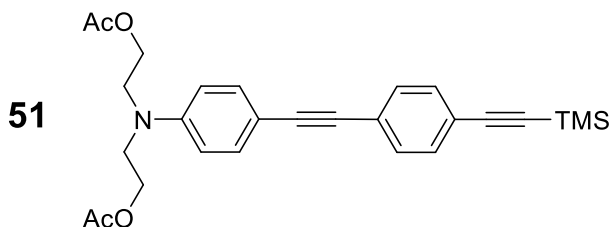
desired compound as a yellow oil (3,70g, 67%). TLC: CH₂Cl₂/EtOAc 98/2. R_f = 0.15. ¹H NMR (300MHz, CDCl₃, ppm): δ 7.33 (m, 6H), 6.65 (d, 2H), 4.18 (t, 3H), 3.57 (t, 4H), 1.99 (s, 6H). HRMS calcd for [C₂₂H₂₂BrNO₄ + H]⁺ at 444.0805 found 444.0804.



50 and **0P0-OAc**: **44** (2.47 g, 8.54 mmol) and *1,4-diodobenzene* (5.63 g, 13.3mmol) are dissolved in 1:1 vol/vol THF/Et₃N (80 mL). The solution is degassed by argon bubbling (20 min). PdCl₂(PPh₃)₂ (120 mg, 0.17mmol) and CuI (65mg, 0.34mmol) are added. The mixture is stirred overnight at room temperature. The mixture is filtered through a short pad of silica gel, eluted with AcOEt. The resulting solution is washed three times with water dried on sodium sulfate filtered and solvents are removed at reduced pressure. Purification by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂ then CH₂Cl₂/EtOAc 9/1, solid deposition of the compound pre-adsorbed on silica) affords the desired compounds as a yellow oil (**50**) or orange solid (**0P0-OAc**) (1.80 g, 43%).

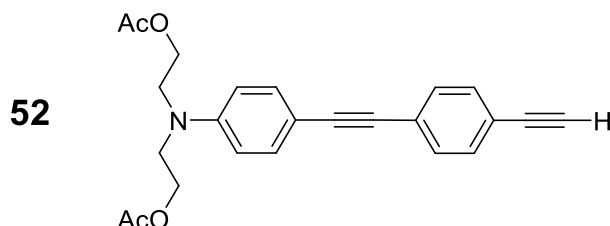
50: TLC: CH₂Cl₂. R_f = 0.70. ¹H NMR (300MHz, CDCl₃, ppm): δ 7.63 (d, 2H), 7.38 (d, 2H), 7.21 (d, 2H), 6.69 (d, 2H), 4.22 (t, 4H), 3.61 (t, 4H), 2.03 (s, 6H).

0P0-OAc: TLC: CH₂Cl₂/EtOAc 9/1. R_f = 0.2. ¹H NMR (300MHz, CDCl₃, ppm): δ 7.41 (s, 4H), 7.36 (d, 4H), 6.67 (d, 4H), 4.21 (t, 8H), 3.60 (t, 8H), 2.03 (s, 12H).

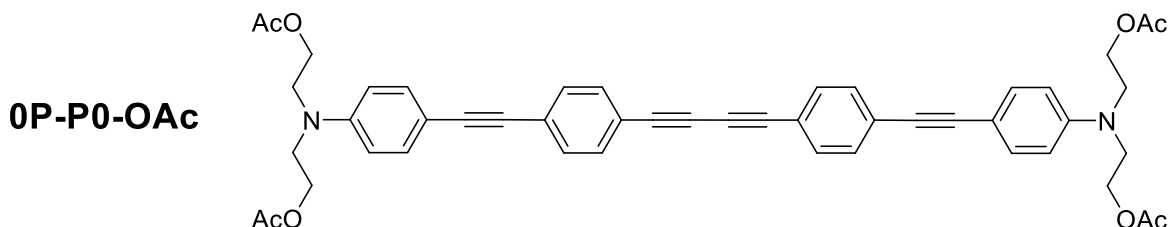


51: To solution of **50** (1.1g, 2.47 mmol) in 1:1. vol/vol Toluene/Et₃N (16 mL), extensively degassed by argon bubbling, PdCl₂(PPh₃)₂(35 mg, 0.05 mmol) CuI (19 mg, 0.10 mmol) and *trimethylsilylacetylene*(0.5 mL, 3.07 mmol) are added. The tube is sealed and the mixture is stirred overnight at 85°C. The resulting solution is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt. The resulting solution is washed three times with water and and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄ filtered and solvents are removed under reduced pressure to afford the desired compound as yellow oil (1.14, 100%). ¹H

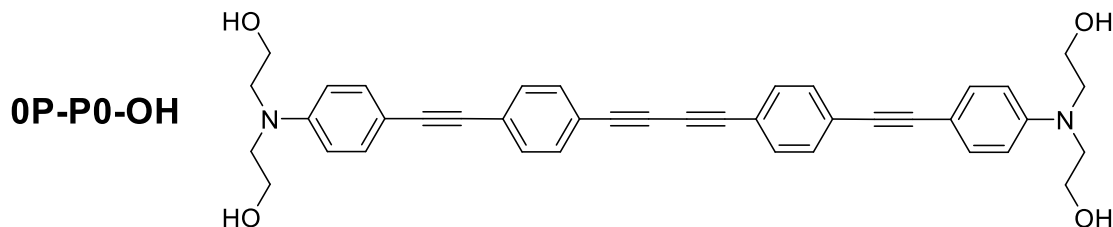
NMR (300MHz, CDCl₃, ppm): δ 7.39 (s, 2H), 7.36 (d, 2H), 6.69 (d, 2H), 4.23 (t, 4H), 3.36 (t, 4H), 2.03 (s, 6H), 0.23 (s, 9H).



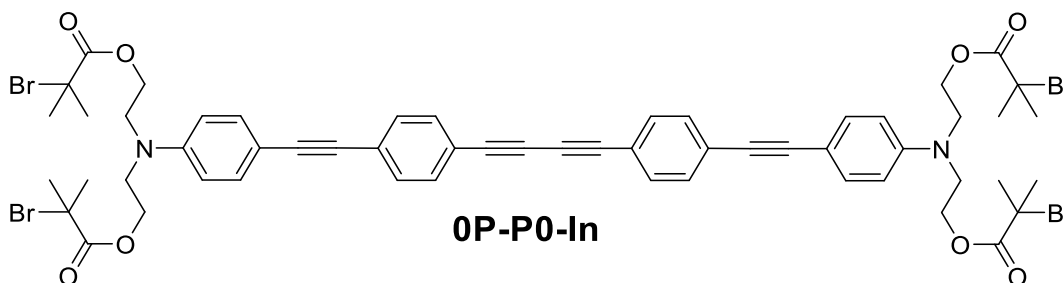
52: A molar solution of *TBAF* in *THF* (6.00 mL, 6.00 mmol) is added to a solution of **51** (2.40 g, 4.60 mmol) dissolved in Et₂O (20mL). After 10 minutes stirring at room temperature, the solution is filtered on a short pad of silica gel and eluted with Et₂O. The resulting solution is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄ filtered and solvents are removed under reduced pressure to afford the desired compound as dark-yellowish oil (96%). ¹H NMR (300MHz, CDCl₃, ppm): δ 7.46 (s, 4H), 7.41 (d, 2H), 6.74 (d, 2H), 4.27 (t, 3H), 3.67 (t, 3H), 3.18 (s, 1H), 2.07 (s, 6H). The product is directly involved in the next step without additional characterization.



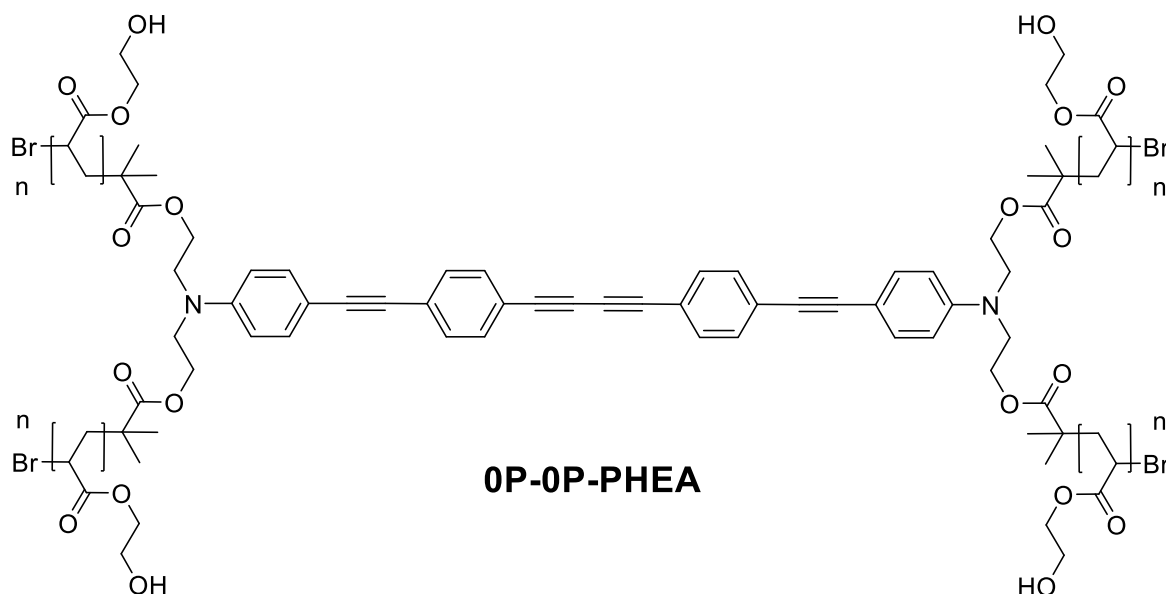
0P-P0-OAc: To a solution of **52** (1.00 g, 1.22 mmol), in THF/Et₃N mixture, is added CuI (20 mg, 0.11 mmol). The solution is exposed to air and stirred overnight at room temperature. After solvent evaporation under reduced pressure, the product is purified on silica gel (CH₂Cl₂/AcOEt : 9/1. solid deposition of the product pre-adsorbed on silica gel) to afford a yellow solid (400 mg, 42%). TLC: CH₂Cl₂/AcOEt 9/1 R_f = 0.20. ¹H NMR (300MHz, CDCl₃, ppm): δ 7.43 (d, 8H), 7.37 (m, 4H), 6.69 (d, 2H), 4.22 (t, 8H), 3.62 (t, 8H), 2.02 (s, 12H). ¹³H NMR (126.3MHz, CDCl₃, ppm): δ 171.8, 147.6, 133.3, 132.5, 131.4, 125.2, 120.7, 111.9, 110.7, 93.4, 87.6, 82.4, 75.6, 61.4, 49.7, 21.0.



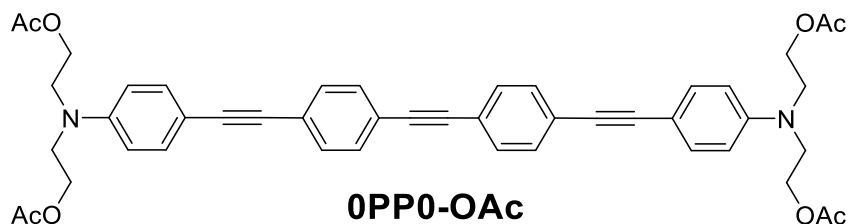
0P-P0-OH: To a solution of **0P-P0-OAc** (281 mg, 0.36 mmol), in 40 mL of THF/MeOH (1:1) mixture, is added K_2CO_3 (1.2g, 8.68 mmol). The solution is stirred during three hours at room temperature. After solvent evaporation, the product is filtered on Wheaton filter and washed several times with distilled water. Freeze-drying affords a yellow solid (209 mg, 95%). 1H NMR (500MHz, DMSO. ppm): δ 7.61 (d, 4H), 7.51 (d, 4H), 7.33 (d, 4H), 6.71 (d, 4H), 4.79 (s, 4H), 3.53 (t, 8H), 3.44 (t, 8H). ^{13}H NMR (126.3MHz, DMSO. ppm): δ 148.49, 132.76, 132.63, 131.09, 124.96, 119.16, 111.29, 107.00, 94.64, 86.89, 82.44, 75.03, 57.98, 53.03.



0P-P0-In: To a solution of **0P-P0-OH** (107 mg, 0.18 mmol), in 20 mL of dry THF. At 0°C pyridine (0.142 mL, 1.75 mmol) and *α*-Bromoisobutyryl bromide (0.130mL, 1.06 mmol). After addition the ice bath is removed and the mixture is stirred three hours at room temperature. The reaction is quenched by addition of water (20mL). The solution is stirred during three hours at room temperature. The mixture is extracted three times with CH_2Cl_2 . The resulting organic solution is washed three times with water, dried on sodium sulfate, filtered, and solvents are removed at reduced pressure. Purification by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2 , solid deposition of the compound pre-adsorbed on silica) affords the desired compound as a yellow solid (170 mg, 80%). 1H NMR (500MHz, $CDCl_3$. ppm): δ 7.44 (d, 8H), 7.39 (d, 4H), 6.73 (d, 4H), 4.35 (t, 8H), 3.73 (t, 8H), 1.89 (s, 24H). ^{13}H NMR (126.3MHz, $CDCl_3$. ppm): δ 171.9, 147.4, 133.5, 132.6, 131.5, 125.2, 120.8, 112.1, 111.1, 93.3, 87.7, 82.4, 75.6, 63.2, 55.6, 49.3, 30.9 (acetone).

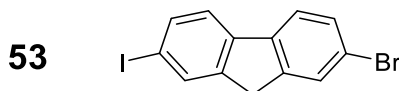


0P-P0-PHEA: **0P-P0-In** (50 mg, 0.04mmol), *2,2'-bipyridine* ligand (12.5mg, 0.08mmol) and CuBr (0.006g, 0.04mmol), are dissolved in a mixture of THF (3mL) and HEA monomer (3mL, 20.5 mmol). Polymerization of the resulting solution is initiated by stirring the mixture at 85 °C. After 20 minutes, reaction is stopped by freezing and adding water. The resulting mixture is transferred into a dialysis membrane (spectra/por membrane, MWCO=1000), and dialyzed against a large volume of deionized water. The external water is regularly replaced at 6H or 12H intervals with fresh water during dialysis (3 days). Finally, the dialysis bag content is filtered and lyophilized to yield 120mg of a yellow polymer. ^1H NMR (500MHz, CDCl_3 , ppm): δ 7.50 (b, 8H), 7.38 (b, 4H), 6.88 (d, 4H), 4.17 (b, 81H), 3.74 (b, 81H), 2.44 (b, 37H), 1.97-1.63 (b, 74H), 1.12 (d, 24). $n = 9-10$ (NMR).

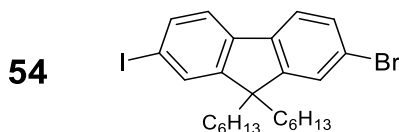


0PP0-OAc: **50** (391 mg, 1.01 mmol) and **47** (450 mg, 0.91 mmol) are dissolved in 1:1 vol/vol THF/ Et_3N (20 mL). The solution is degassed by argon bubbling (20 min). $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (13 mg, 0.02 mmol) and CuI (7 mg, 0.004mmol) are added. The mixture is stirred overnight at room temperature. The mixture is filtered through a short pad of silica gel, eluted with AcOEt . The resulting solution was washed three times with water dried on sodium sulfate filtered and solvents are removed at reduced pressure. Purification by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2)

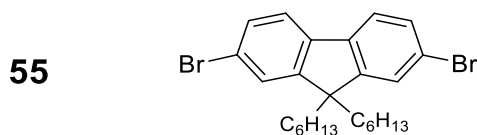
afforded the desired compound as a yellow oil (620 mg, 90%). TLC: CH₂Cl₂/AcOEt 9/1 R_f = 0.70. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, ppm): δ 7.44 (s, 8H), 7.37 (d, 4H), 6.77 (d, 4H), 4.20 (t, 8H), 3.59 (t, 8H), 2.01 (s, 12H). ¹³H NMR (126.3MHz, CDCl₃, ppm): δ 170.94, 147.4, 133.2, 131.6, 131.3, 124.1, 122.2, 111.8, 110.7, 92.5, 91.0, 87.6, 61.3, 49.6, 20.9.



53: 2-bromo-fluorene (10 g, 40.8 mmol) is dissolved in 93:5:2 vol/vol/vol glacial acetic acid/water/H₂SO₄ concentrate (180 mL). I₂ (4.32 g, 17.0 mmol) and HIO₃ (1.72, 9.80 mmol) are added. The solution is heated at 85°C during 2 hours. The mixture is cooled with ice bath and the solid is filtered. The solid was washed with cold glacial acetic acid the water (4 times). The solid is dried during one night in an oven at 50°C to afford the desired compound as a slightly yellow solid (10.580g, 70%). ¹H NMR (300MHz, CDCl₃, ppm): δ 7.85 (s, 1H), 7.66 (m, 2H), 7.56 (m, 1H), 7.47 (m, 2H), 3.82 (s, 2H).

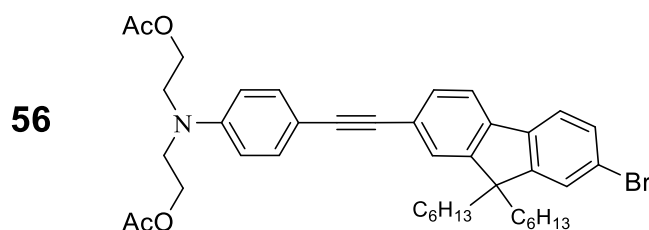


54: **53** (10.58 g, 19.6 mmol) is dissolved in DMSO (80 mL). Triethyl-benzyl ammonium (380 mg, 1.66 mmol) and caustic solution 50% (10.5mL) are added. Bromo-hexane (12mL, 85.5 mmol) is introduced drop by drop at room temperature. The solution is stirred and heated at 65°C during 3.5 hours. When the solution is cold to ambient temperature AcOEt (80mL) is added. The mixture is filtered via Buchner and the solid is washed three times with AcOEt. The filtrate solution is washed one time with HCl one molar solution, three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄, filtered, solvents are removed under reduced pressure. The product is purified on silica gel (Pentane) to afford the desired compound as yellow oil (13.81 g, 90%). TLC: Pentane, R_f = 0.95. ¹H NMR (300MHz, CDCl₃, ppm): δ 7.64 (m, 2H), 7.45 (m, 4H), 1.91 (m, 4H), 1.04 (m, 12H), 0.77 (t, 6H), 0.57 (m, 4H).

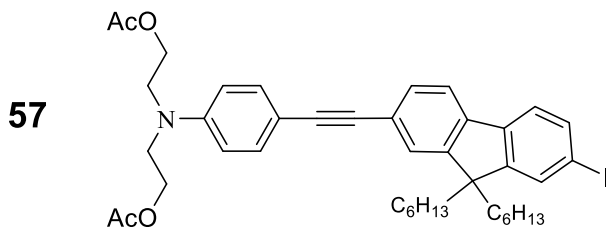


55: 2,7-dibromofluorene (4 g, 12.3 mmol) is dissolved in DMSO (35 mL). Triethyl-benzyl ammonium (165 mg, 0.72mmol) and caustic solution 50% (6.6mL) are added. Bromo-hexane (5.2

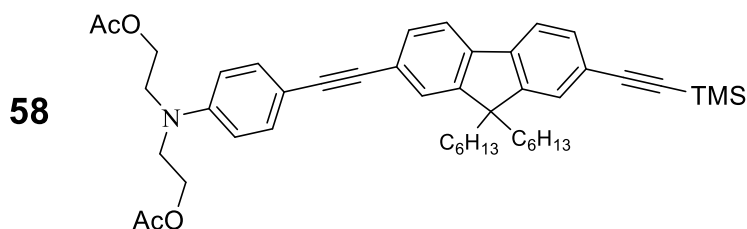
mL, 37.1 mmol) is introduced drop by drop at room temperature. The solution is stirred and heated at 65°C during 3.5 hours. When the solution is cold to ambient temperature AcOEt (80mL) is added. The mixture is filtered via Buchner and the solid is washed three times with AcOEt. The filtrate solution is washed one time with HCl one molar solution, three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄, filtered, solvents are removed under reduced pressure. The product is purified on silica gel (Pentane) to afford the desired compound as yellow oil (5.20 g, 86%). TLC: Pentane. R_f = 0.70. ¹H NMR (300MHz, CDCl₃, ppm): δ 7.52-7.42 (m, 6H), 1.91 (m, 4H), 1.05 (m, 12H), 0.77 (t, 6H), 0.59 (m, 4H).



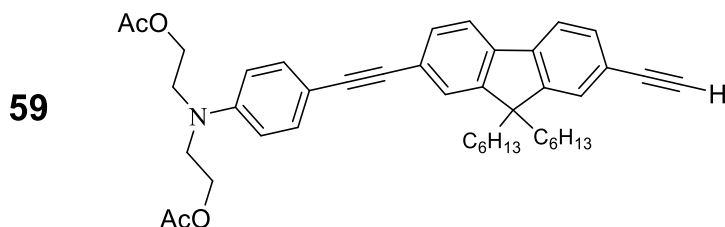
56: **44** (2.55 g, 8.81 mmol) and **54** (3.96 g, 7.34 mmol) are dissolved in 1:1 vol/vol THF/Et₃N (60 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. Pd(PPh₃)₂Cl₂ (160 g, 0.23) and CuI (80 mg, 0.42) are added. The solution is stirred overnight at room temperature during 12 hours. Solvents are removed under reduced pressure and the crude product is dissolved in AcOEt. The resulting solution is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt. The resulting solution is washed one time with saturated NH₄Cl solution, three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄, filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (CH₂Cl₂) to afford the desired compound as yellow oil (5.00 g, 81%). TLC: (PE / CH₂Cl₂: 10/0.5) R_f = 0.30. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.60-7.40 (m, 8H), 6.71 (d, 2H), 4.24 (t, 4H), 3.64 (t, 4H), 2.04 (s, 6H), 1.91 (m, 4H), 1.03 (m, 12H), 0.75 (t, 6H), 0.58 (m, 4H). HRMS calcd for [C₄₁H₅₀BrNO₄ + H]⁺ at 700.3005 found 700.2996.



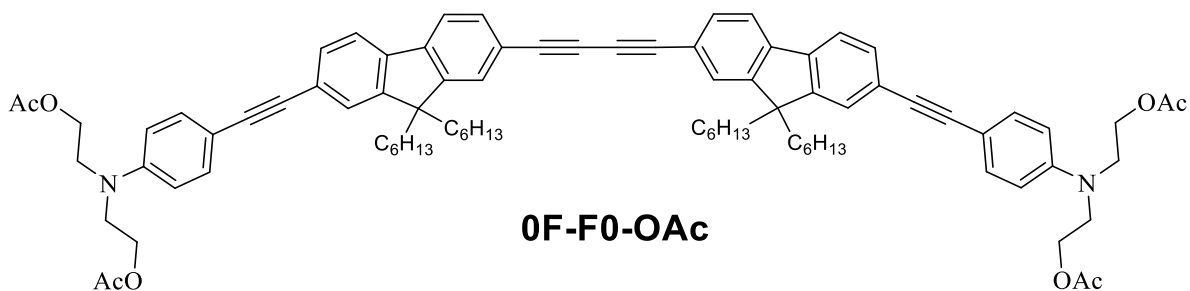
57: **44** (1.18 g, 4.08 mmol) and 1,7-diiodo5,5'-dihexyl-fluorene (laboratory product) (4.78 g, 18.1 mmol) are dissolved in 1:1 vol/vol THF/Et₃N (80 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. Pd(PPh₃)₂Cl₂ (57.3 mg, 0.08 mmol) and CuI (31 mg, 0.16 mmol) are added. The solution is stirred overnight at room temperature during 12 hours. Solvents are removed under reduced pressure and the crude product is dissolved in AcOEt. The resulting mixture is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt. The resulting solution is washed one time with saturated NH₄Cl solution, three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄, filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (CH₂Cl₂) to afford the desired compound as yellow oil (1.74 g, 57 %). TLC: (CH₂Cl₂) R_f = 0.80. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.68-7.64 (m, 3H), 7.61-7.42 (m, 5H), 6.75 (d, 2H), 4.28 (t, 4H), 3.68 (t, 4H), 2.07 (s, 6H), 1.95 (m, 4H), 1.07 (m, 12H), 0.80 (t, 6H), 0.61 (m, 4H).



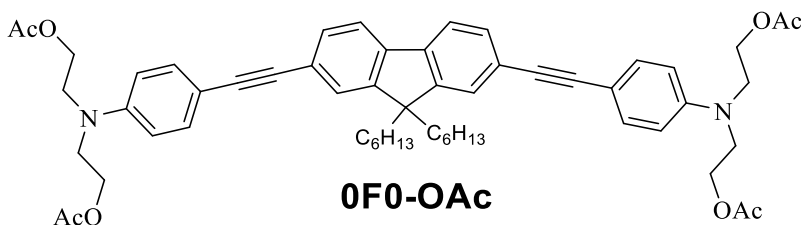
58: **57** (1.39 g, 1.91 mmol) is dissolved in 1:1 vol/vol THF/Et₃N (15 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. Pd(PPh₃)₂Cl₂ (30 mg, 0.04 mmol) and CuI (15 mg, 0.08 mmol) are added. Then *TMSA* (0.4 mL, 7.64 mmol) is introduced through the septum via a syringe. The reaction mixture is stirred overnight at room temperature during 12 hours. Solvents are removed under reduced pressure and the crude product is dissolved in AcOEt. The resulting solution is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt. The resulting solution is washed one time with saturated NH₄Cl solution, three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄, filtered and solvents are removed under reduced pressure to afford the desired compound as yellow brown oil (1.30 g, 95%). R_f = 0.30. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.64-7.27 (m, 8H), 6.74 (d, 2H), 4.27 (t, 4H), 3.66 (t, 4H), 2.06 (s, 6H), 1.97 (m, 4H), 1.05 (m, 12H), 0.78 (t, 6H), 0.59 (m, 4H), 0.31 (s, 9H). HRMS calcd for [C₄₆H₅₉NO₄Si + H]⁺ at 718.42 found 718.42.



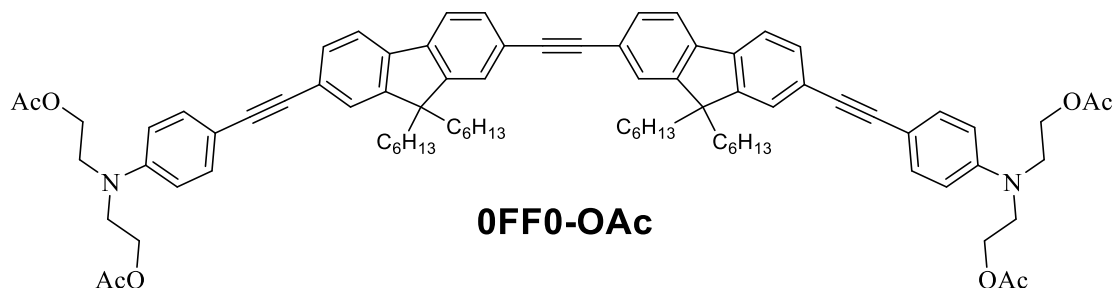
59: A molar solution of *TBAF* in *THF* (1.30 mL, 1.30 mmol) is added to a solution of **58** (600 mg, 0.84 mmol) in Et₂O (20mL). The mixture is stirred for 10 min at room temperature and the solution is filtered through a short pad of silica gel and eluted with Et₂O. The resulting solution is washed three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The organic layer is dried with Na₂SO₄ filtered and solvents are removed under reduced pressure to afford the desired compound as yellow brown oil (477 mg, 88%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.90-7.52 (m, 8H), 6.98 (d, 2H), 4.52 (t, 4H), 3.92 (t, 4H), 3.41 (s, 1H), 2.31 (s, 6H), 2.22 (m, 4H), 1.30 (m, 12H), 1.03 (t, 6H), 0.86 (m, 4H).



0F-F0-OAc: To a solution of **59** (477 mg, 0.74 mmol), in 1:1 vol/vol THF/Et₃N (20 mL), CuI is added (20 mg, 0.11 mmol). The solution is exposed to air and stirred overnight at room temperature. After solvent evaporation under reduced pressure, the product is purified on silica gel (CH₂Cl₂/AcOEt: 9/1. solid deposition of the product pre-adsorbed on silica gel) to afford the desired compound as a yellow solid (400 mg, 84%). TLC: CH₂Cl₂/AcOEt 9/1 R_f = 0.3. ¹H NMR (500MHz, CDCl₃. ppm): δ 7.62 (m, 2H), 7.51-7.45 (m, 8H), 7.42 (d, 2H), 6.71 (d, 2H), 4.24 (t, 8H), 3.64 (t, 8H), 2.04 (s, 12H), 1.94 (m, 8H), 1.03 (m, 24H), 0.76 (t, 12H), 0.58 (m, 8H). ¹³H NMR (126.3MHz, CDCl₃. ppm): δ 171.1, 151.4, 151.3, 147.4, 141.9, 139.9, 133.3, 131.8, 130.7, 127.1, 125.9, 123.3, 120.4, 120.3, 120.1, 111.9, 111.2, 90.9, 88.8, 83.4, 74.6, 61.5, 55.4, 49.7, 40.5, 31.7, 29.9, 23.9, 22.8, 21.1, 14.2. HRMS calcd for [C₈₆H₁₀₀N₂O₈ + 2H]²⁺ at 645.3813 found 645.3790.

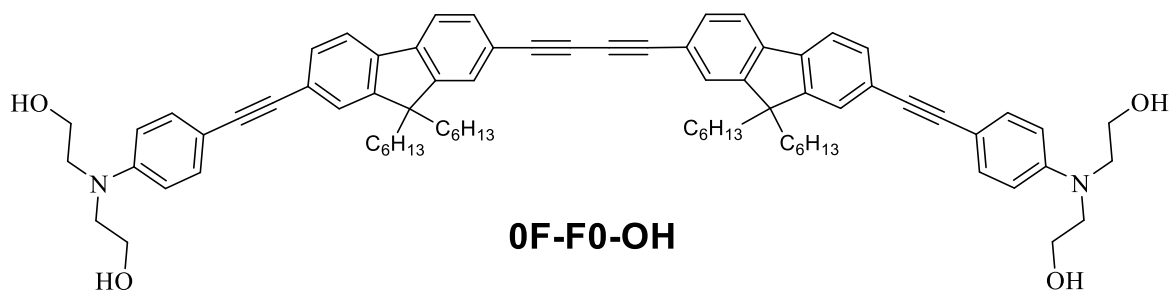


0F0-OAc: **44** (2.60 g, 8.99 mmol) and **55** (2.00 g, 4.06 mmol) are dissolved in 1:1 vol/vol toluene/Et₃N (30 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. Pd(PPh₃)₂Cl₂ (30 mg, 0.04) and CuI (10 mg, 0.05) are added. The reaction mixture is stirred overnight at room temperature during 12 hours. Solvents are removed under reduced pressure and the crude product is dissolved in AcOEt. The resulting mixture is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt. The resulting solution is washed one time with saturated NH₄Cl solution, three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄, filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (CH₂Cl₂/AcOEt 9/1) to afford the desired compound as yellow oil (5.00 g, 81%). TLC: CH₂Cl₂/AcOEt 9/1 R_f = 0.3. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.64 (m, 2H), 7.51-7.44 (m, 8H), 6.74 (d, 4H), 4.28 (t, 8H), 3.67 (t, 8H), 2.07 (s, 12H), 1.99 (m, 4H), 1.06 (m, 12H), 0.78 (t, 6H), 0.62 (m, 4H). HRMS calcd for [C₅₇H₆₈N₂O₈ + H]⁺ at 900.5048 found 900.5030.

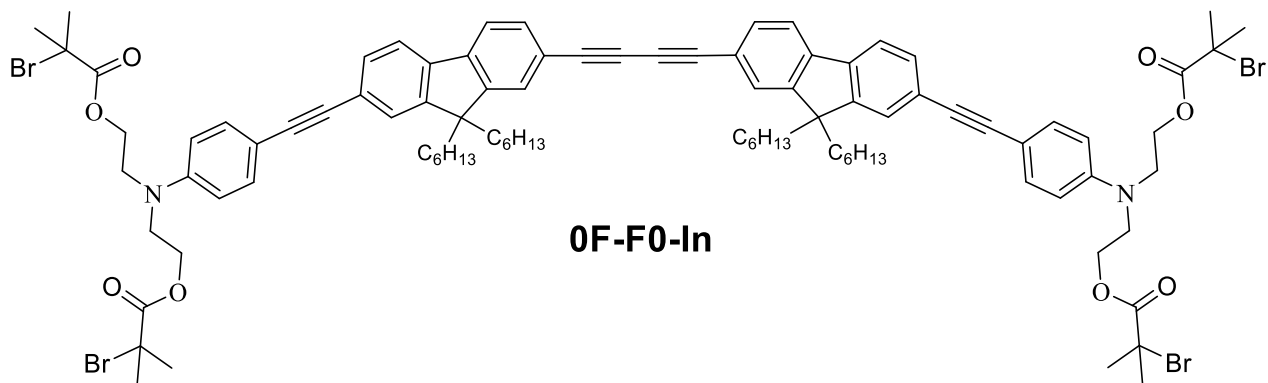


0FF0-OAc: **57** (1.55 g, 2.41 mmol) and **59** (1.50 g, 2.01 mmol) are dissolved in 1:1 vol/vol toluene/Et₃N (30 mL). The solution is extensively degassed by argon bubbling for 20 min. Pd(PPh₃)₂Cl₂ (30 mg, 0.04) and CuI (10 mg, 0.05) are added. The reaction mixture is stirred overnight at room temperature during 12 hours. Solvents are removed under reduced pressure and the crude product is dissolved in AcOEt. The resulting solution is filtered through a short pad of silica gel and eluted with AcOEt. The resulting solution is washed one time with saturated NH₄Cl solution, three times with water and pre-dried by washing with saturated sodium chloride solution. The solution is dried with Na₂SO₄, filtered and solvents are removed under reduced pressure, the product is purified on silica gel (CH₂Cl₂/AcOEt 95/5) to afford the desired compound as yellow oil

(1.80 g, 71%). TLC: CH₂Cl₂/AcOEt 95/5 R_f = 0.55. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.72-7.48 (m, 16H), 6.78 (d, 4H), 4.31 (t, 8H), 3.71 (t, 8H), 2.10 (s, 12H), 2.03 (m, 8H), 1.16-1.08 (m, 24H), 0.82 (t, 12H), 0.65 (m, 8H). ¹³C NMR (126.3 MHz, CDCl₃, ppm): δ 171.1, 151.1, 151.1, 147.2, 140.9, 140.1, 133.1, 130.7, 125.9, 125.7, 122.7, 121.8, 120.1, 119.9, 111.7, 111.1, 90.8, 90.6, 88.7, 61.3, 55.3, 49.6, 40.6, 31.6, 29.8, 23.8, 22.7, 22.7, 20.9, 14.1. HRMS calcd for [C₈₄H₁₀₀N₂O₈ + 2H]²⁺ at 633.3813 found 633.3788.

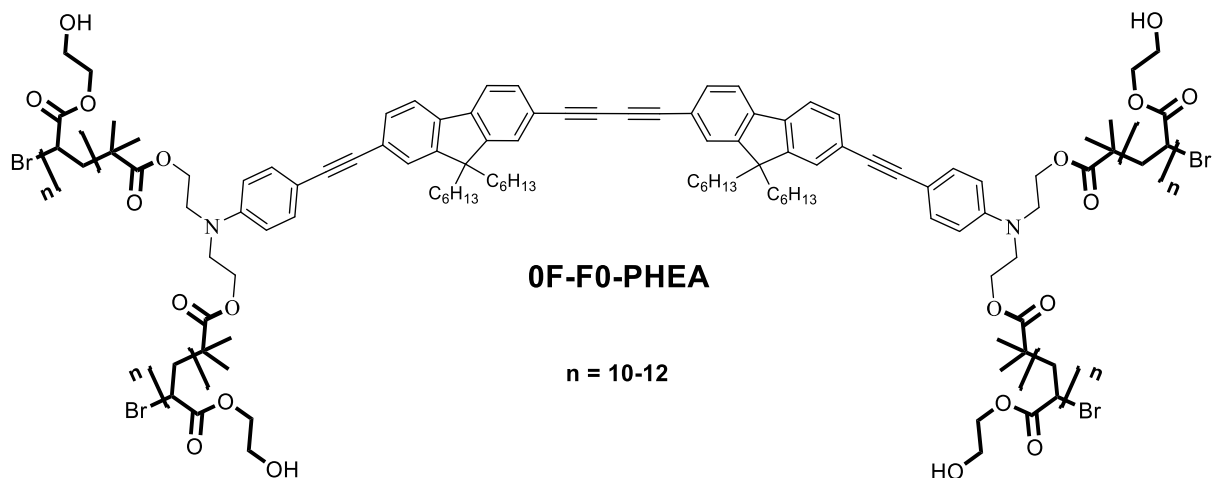


0F-F0-OH: To a solution of **0F-F0-OAc** (67 mg, 0.05 mmol), in 40 mL of THF/MeOH (1:1) mixture, is added K₂CO₃ (171 mg, 1.24 mmol). The solution is stirred during three hours at room temperature. After solvent evaporation, the product is filtered on Wheaton filter and washed several times with distilled water. Freeze-drying affords a yellow solid (56 mg, 95%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, ppm): δ 7.44 (m, 4H), 7.60 (s, 2H), 7.52 (m, 4H), 7.43 (m, 2H), 7.31 (d, 4H), 6.72 (d, 4H), 4.16 (t, 4H), 3.69 (t, 8H), 3.55 (t, 8H), 2.06 (t, 8H), 1.08 (m, 24H), 0.78 (t, 12H), 0.63 (m, 8H).

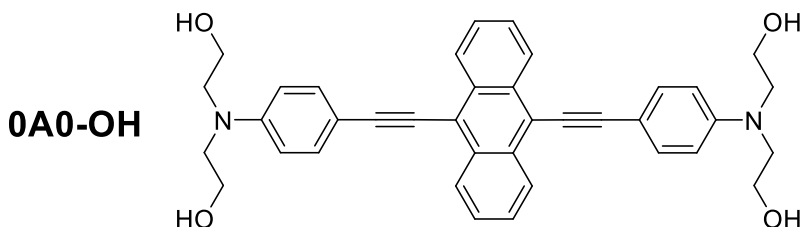


0F-F0-In: To a solution of **0F-F0-OH** (40 mg, 0.036 mmol) in 4 mL of dry THF. At 0°C pyridine (0.041 mL, 0.51 mmol) and α-Bromoisobutyryl bromide (0.021 mL, 0.18 mmol). After addition the ice bath is removed and the mixture is stirred three hours at room temperature. The reaction is quenched by addition of water (20 mL). The solution is stirred during three hours at room temperature. The mixture is extracted three times with CH₂Cl₂. The resulting organic solution is washed three times with water, dried on sodium sulfate, filtered, and solvents are removed at reduced

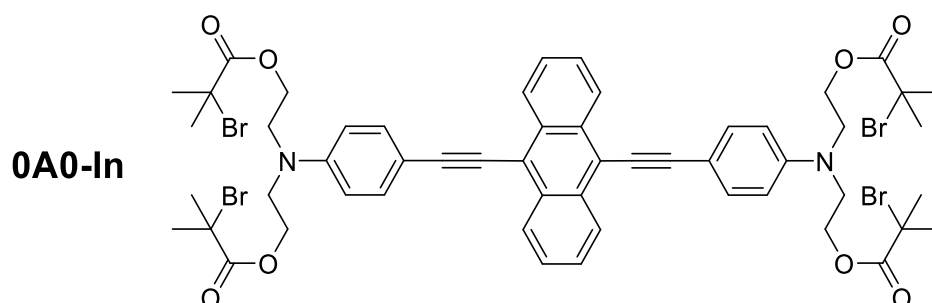
pressure. Purification by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2 , solid deposition of the compound pre-adsorbed on silica) affords the desired compound as a yellow solid (50 mg, 80%). ^1H NMR (500MHz, CDCl_3 , ppm): δ 7.68-7.46 (m, 16H), 6.80 (d, 4H), 4.41 (t, 8H), 3.78 (t, 8H), 1.93 (s, 24H), 1.88 (m, 8H), 1.16-1.08 (m, 24H), 0.81 (t, 12H), 0.65 (m, 8H).



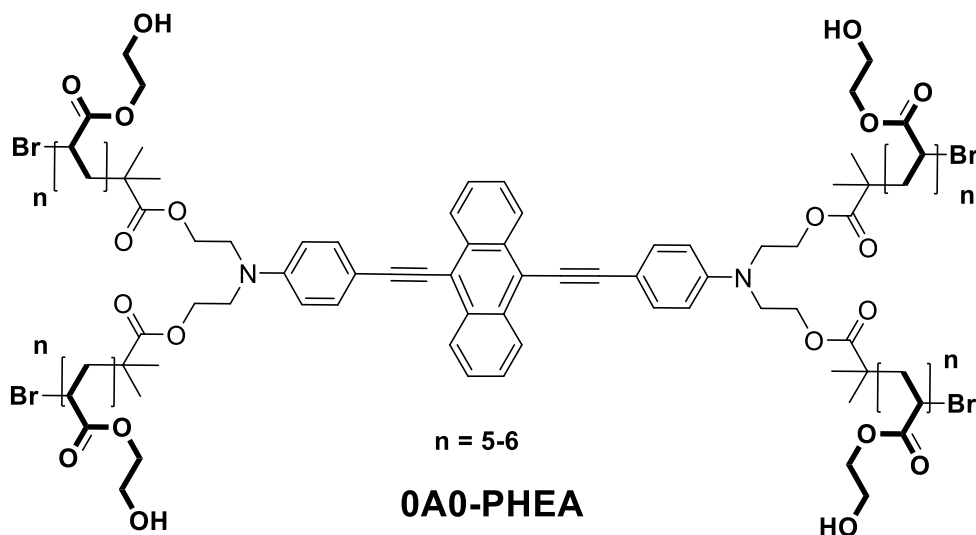
0F-F0-PHEA: **0F-F0-In** (40 mg, 0.023 mmol), 2,2'-bipyridine ligand (7.2 mg, 0.046 mmol) and CuBr (3.4 mg, 0.046 mmol), are dissolved in a mixture of THF (1.7 mL) and HEA monomer (1.7 mL, 11.8 mmol). Polymerization of the resulting solution is initiated by stirring the mixture at 85 °C. After 20 minutes, reaction is stopped by freezing and adding water. The resulting mixture is transferred into a dialysis membrane (spectra/por membrane, MWCO=1000), and dialyzed against a large volume of deionized water. The external water is regularly replaced at 6H or 12H intervals with fresh water during dialysis (3 days). Finally, the dialysis bag content is filtered and lyophilized to yield 120mg of a yellow polymer.



0A0-OH: To a solution of **0A0-OAc** (3.4 g, 4.52 mmol), in 380 mL of THF/MeOH (1:1) mixture, is added K_2CO_3 (9 g, 66.4 mmol). The solution is stirred during three hours at room temperature. After solvent evaporation, the product is filtered on Wheaton filter and washed several times with distilled water. Freeze-drying affords a red solid (2.26 g, 86%). ^1H NMR (500MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm): δ 8.72 (dd, 4H), 7.71-7.63 (m, 8H), 6.87 (d, 4H), 4.21 (t, 4H), 3.80 (t, 8H), 3.66 (t, 8H).

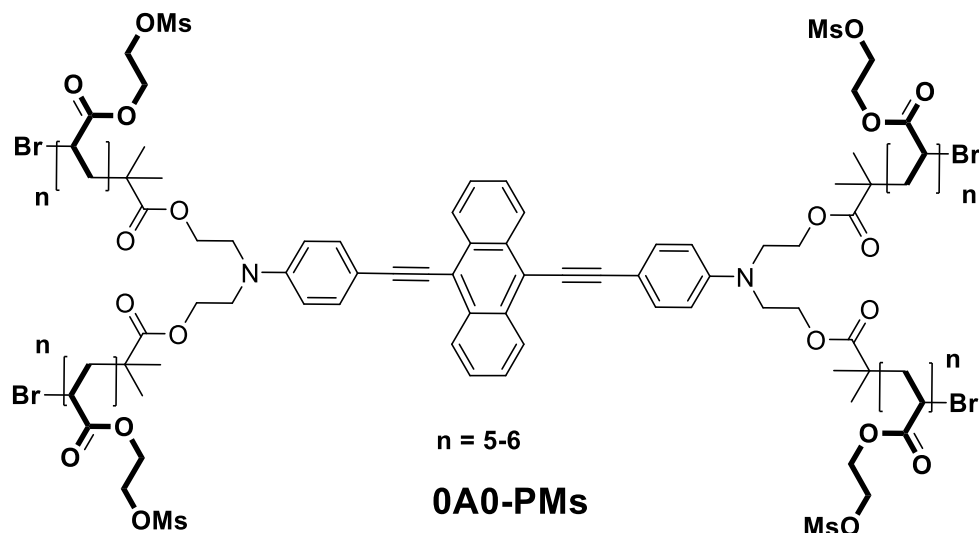


0A0-In: To a solution of **0A0-OH** (1.72 g, 2.95 mmol) in 80 mL of dry THF. At 0°C pyridine (2.15 mL, 26.6 mmol) and *α*-Bromoisobutyryl bromide (1.82 mL, 14.75 mmol). After addition the ice bath is remove and the mixture is stirred three hours at room temperature. The reaction is quenched by addition of water (40mL). The mixture is stirred during three hours at room temperature. The mixture is extracted three times with CH₂Cl₂. The resulting organic solution is washed three times with water dried on sodium sulfate, filtered and solvents are removed under reduced pressure. Purification by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂, solid deposition of the compound pre-adsorbed on silica) affords the desired compound as a yellow solid (170 mg, 80%). ¹H NMR (500MHz, CDCl₃, ppm): δ 8.67 (dd, 4H), 7.66-7.58 (m, 8H), 6.84 (d, 4H), 4.40 (t, 8H), 3.79 (t, 8H), 1.91 (s, 24H).

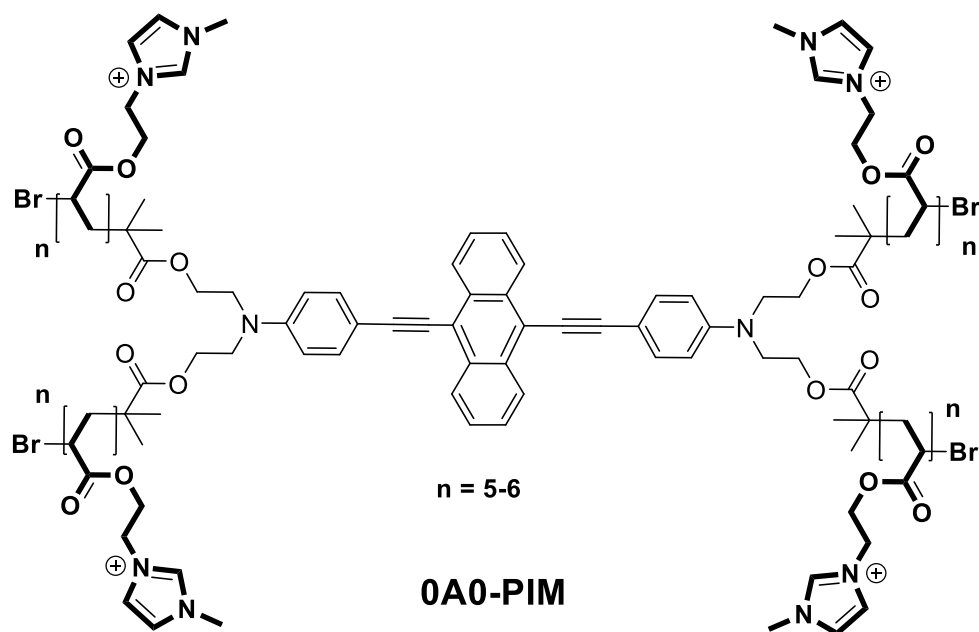


0A0-PHEA: **0A0-In** (750 mg, 0.64 mmol), 2,2'-bipyridine ligand (800 mg, 5.1 mmol) and CuBr (387 mg, 2.7 mmol), are dissolved in a mixture of THF (13.5mL) and HEA monomer (13.5mL, 328 mmol) polymerization of the resulting solution is initiated by stirring the mixture at 85 °C. After 20 minutes, reaction is stopped by freezing and adding water. The resulting mixture is transferred into a dialysis membrane (spectra/por membrane, MWCO=1000), and dialyzed against

a large volume of deionized water. The external water is regularly replaced at 6h or 12h intervals with fresh water during dialysis (3 days). Finally, the dialysis bag content is filtered and lyophilized to yield 1.752g of a red polymer. ^1H NMR (500MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, ppm): δ 8.7 (b, 4H), 7.7 (b, 8H), 7.0 (b, 4H), 4.2 (b, 54H), 3.7 (b, 55H), 2.4 (b, 23H), 2.1-1.3 (b, 40H), 1.1 (b, 24H). $n = 5-6$ (NMR).



0A0-PMs: **0A0-PHEA** (450mg, 0.138 mmol) is dissolved in dry CH_2Cl_2 . At 0°C , methanesulfonyl chloride (426 mg, 3.7 mmol) is added by portion and the solution is stirred during 12h at room temperature. The resulting organic solution is washed three times with water, dried on sodium sulfate filtered and solvents are removed at reduced pressure. The oil is dissolved in CH_2Cl_2 and precipitation is achieved by addition of the solution into MeOH (*3) to afford the desired compound as a red oil (424 mg). ^1H NMR (500MHz, CDCl_3 , ppm): δ 8.61 (b, 4H), 7.58 (b, 8H), 6.82 (b, 4H), 4.31 (b, 84H), 3.67 (b, 10H), 3.01 (b, 51H), 2.36 (b, 21H), 2.01-1.47 (b, 40H), 1.09 (b, 24H). $n = 5-6$ (NMR). Between 17 and 20 functions have been mesylated (depending on the integral use for calculation), which corresponds to about 80% functionalization



0A0-PIM: 0A0-PMs (424mg, 0.092 mmol) is dissolved in dry DMF (10mL) in a sealed tube. N-methyl imidazole (625 μ L, 7.8 mmol) is added with a syringe via the septum. The resulting mixture is stirred one night à 85°C. DMF is removed under high vacuum. The resulting residue is dissolved in NaCl saturated solution and transferred into a dialysis membrane (spectra/por membrane, MWCO=1000), and dialyzed against a large volume of deionized water with NaCl (15g/L). The external water is regularly replaced at 6H or 12H intervals with fresh water during dialysis (3 days) the two last dialyses being performed against deionized water. Finally, the dialysis bag content is filtered and lyophilized to afford the desired compound as a red solid (300 mg). ^1H NMR (500MHz, CD_3OD . ppm): δ 8.71 (b, 4H), 7.68 (b, 31H), 6.82 (b, 4H), 4.57-4.41 (b, 55H), 3.97-3.75 (b, 55H), 2.39 (b, 21H), 1.91-1.56 (b, 40H), 1.12 (b, 24H). $n = 5-6$ (NMR). Between 17 and 20 functions have a methyl imidazolium fonction (depends on the integral use for calculation). The conversion of mesylate is quantitative.

I.2) Spectroscopy Methods

I.2.a) UV-visible

UV-Visible spectra are recorded with Jasco 670 UV-Visible spectrophotometer. The luminescence spectra are measured using a Horiba-Jobin Yvon Fluorolog-3[®] spectrofluorimeter. ϵ is calculated with diluted solutions with optical density between 0.1 and 0.3.

I.2.b) Fluorescence

The steady-state luminescence is excited by unpolarized light from a 450W xenon CW lamp and detected at an angle of 90° for diluted solution measurements (10 mm quartz cuvette) by a red-sensitive Hamamatsu R928 photomultiplier tube. Spectra are reference corrected for both the excitation source light intensity variation (lamp and grating) and the emission spectral response (detector and grating). Fluorescence quantum yields Q are measured in diluted solutions with an optical density lower than 0.1 using the relative method based on following equation:

$$\varphi_s = \varphi_{ref} \left(\frac{A_s}{A_{ref}} \right) \left(\frac{DO_{ref}}{DO_s} \right) \left(\frac{\eta_s}{\eta_{ref}} \right)^2$$

where optical density is the absorbance at the excitation wavelength (λ), η the refractive index and A the integrated luminescence intensity. “ref” and “s” stand for reference and sample. Reference is notified for each experiment. Excitation of reference and sample compounds is performed at the same wavelength.

Fluorescence lifetime measurements are performed in chloroform at 290K on a Horiba-Jobin-Yvon Fluorolog-3[®] spectrofluorimeter, equipped with a NanoLED 440L source operating at 440 nm with 250ps pulses, a iHR320 emission monochromator with 1200 groves.mm-1 gratings and a R928 detector.

Non-linear studies

I.2.c) Singlet oxygen

Singlet-oxygen phosphorescence are recorded using a liquid nitrogen cooled, solid Indium/Gallium/Arsenic detector (850-1600 nm), and singlet oxygen generation quantum yield are deduced from the same relative method as depicted for fluorescence quantum yield using phenalene as a reference ($\varphi_\Delta = 0.98$ in CHCl_3). Excitation of reference and sample in diluted chloroform solutions compounds was performed at the same wavelength.

I.2.d) Z-scan TPA measurement

The Z-scan technique is used to determine both the nonlinear refraction and nonlinear absorption of bulk samples. For the Z-scan measurement, a water solution of the studied compound (**0A0-PHEA** or **0A-A0-PHEA**) is placed in a cell which is set in motion along the focused Gaussian-shaped laser beam. Closed aperture (CA) and open aperture (OA) Z-scan traces are recorded simultaneously in a single Z-scan run and used to determine the bulk nonlinear optical parameters of the solutions. The experimental setup is described elsewhere. Briefly, ~130 fs pulses are delivered by a Quantronix Integra-C regenerative amplifier operating as a 800 nm pump and a Quantronix-Palitra-FS BIBO crystal-based optical parametric amplifier, with the repetition rate of 1 kHz. The output from the Palitra is appropriately filtered and attenuated to microjoule per pulse energy range. The beam is focused to a focal spot of the beam waist $w_0 = 25 - 60 \mu\text{m}$, which resulted in peak intensities in the range from 60 to 150 $\text{GW}\cdot\text{cm}^{-2}$. Three InGaAs photodiodes (Thorlabs) collected the reference signal, the OA signal, and the CA signal. The data is analyzed as described in previous reports to obtain microscopic nonlinear optical parameters of the molecules.

I.2.e) Two photon induced fluorescence

The TPA cross-section spectra are obtained by two-photon excited fluorescence measurement of diluted dichloromethane solutions of the compound using a Ti:sapphire femtosecond laser in the range 700-900 nm. The excitation beam (5 mm diameter) is focalized with a lens (focal length 10 cm) at the middle of the fluorescence cell (10 mm). The fluorescence, collected at 90° to the excitation beam, is focused into an optical fiber (diameter 600 μm) connected to an Ocean Optics S2000 spectrometer. The incident beam intensity is adjusted to 50 mW in order to ensure an intensity-squared dependence of the fluorescence over the whole spectral range. The detector integration time is fixed to 1 s. Calibration of the spectra is performed by comparison with the published 700-900 nm Coumarin-307 and fluorescein two photon absorption spectra. [1][1] The measurements are done at room temperature in dichloromethane and at concentrations around 10^{-4} M.

I.2.f) In vivo TLPSM

In accordance with the policy of Grenoble Institute of Neuroscience (GIN) and the French legislation, experiments are done in compliance with the European Community Council Directive

of November 24, 1986 (86/609/EEC). The research involving animals is authorized by the *Direction Départementale des Services Vétérinaires de l'Isère – Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, France* and the *Direction Départementale de la protection des populations - Préfecture de l'Isère-France* (F. Appaix, PhD, permit number 38 09 39). All efforts are made to minimize the number of mice used and their suffering during the experimental procedure. CD1 Mice are housed in cages with food and water *ad libitum* in a 12 h light/dark cycle at 22 ± 1 °C.

For *in vivo* TPLSM, 4 months old CD1 mice (n=6) are anesthetized using isoflurane (5% for induction and 1-2% during experiments) in a 70% air, 30% O₂ gas mixture. Their body temperature was monitored with a rectal probe and maintained at 36°C using a heating blanket. MouseOx system (STARR Life Sciences Corp.) for monitoring arterial O₂ Saturation, Heart and Breath Rate is used.

A catheter (Neoflon™, BD, USA) is inserted in the tail vein for an intravenous (iv) injection of 100µL of compound (**0A-0A-PHEA**, **00-00-PHEA**, **0A0-PHEA**) (5 mg/ml) in saline just before the imaging experiments. For co-marking experiment with **0A-0A-PHEA**, Fluorescein IsoThioCyanate-dextran (FITC-dextran, 70 kDa) is diluted at 100 mg/ml concentration in saline and 0.1 ml is injected 2h after the first iv injection.

For intravital two-photon imaging of the cerebral vasculature, a craniotomy of 2-3 mm in diameter is performed with a dental drill above the motor cortex and filled with ultrasound gel. In some experiments, the skull is thinned instead of a craniotomy using the same drill. The head is fixed in a homebuilt stereotactic frame.

TPLSM is performed using a LSM 7MP (Zeiss, Germany) equipped with a 20x water-immersion objective (NA 1.0; Zeiss) and ZEN 2010 software. Red Fluorescence light emission is collected in the epifluorescence configuration using two photomultiplier tubes in the epi-collection mode with a FF01 617/73 nm filter (Semrock, US) in front of the 'red PMT' and FF01 542/50 filter in front of the 'green PMT'.

Laser excitation at 800 nm is done using a Ti:Sapphire laser (Chameleon Vision II; Coherent, UK). All the TPLSM images are obtained with less than 50 mW laser power at the cortical surface. Most 3D two-photon microscopic images are acquired as z-stacks with 607x607 µm X-Y plan size and a 2 µm step size between each focus plan. The z-projections are performed with ImageJ software [342] and Vaa3D software is used for 3D images reconstruction (Extensible visualization and

analysis for multidimensional images using Vaa3D. Peng H., Bria A., Zhou Z., Iannello G., and Long F., Nature Protocols, Vol. 9, No. 1, pp. 193-208, 2014).

I.2.g) Immunolabeling

The mouse is decapitated two hours after injection of the probes; the brain is removed and fixed with PFA 4% in Phosphate Buffer Saline (PBS) overnight (maximum 24h) at 4°C. Then, the brain is sliced and the slices are incubated in PBS with 0.3% triton-X100 (PBST) and 3% fetal calf serum (FCS) for 1 hour at room temperature.

For co-marking, the incubation with the antibody anti-Neuronal Class III β -Tubulin (1:500, Covance) in 1% FCS-PBST is performed overnight at 4°C. Then, after several rinses in PBS, slices are incubated with fluorescent secondary antibodies diluted in 1% FCS-PBST for 2 hours at room temperature: anti-mouse FITC-conjugated (1:500; Sigma-Aldrich). In some experiences, brain slices are directly observed on the two-photon microscope without immunohistochemistry.

II Annexe n°2 : Mesures photophysiques

II.1) Mesure de section efficace d'ADP

Seules les méthodes de mesure de l'absorption à deux photons (ADP) dégénérée seront évoquées ici. Deux méthodes sont usuellement utilisées dans ce cadre. La détermination de la section efficace d'absorption à deux photons peut être réalisée par détection de la fluorescence en résultant (TPIF : Two Photon Induced Fluorescence) ou par mesure directe de la partie imaginaire de la polarisabilité d'ordre trois (Z-scan)[343].

II.1.a) Mesure de l'absorption à deux photons par la méthode d'excitation de fluorescence à deux photons (TPEF)

L'intensité de fluorescence est une valeur strictement proportionnelle au nombre de photons absorbés, auquel elle est reliée par le rendement de fluorescence φ_f . Cette relation est indépendante du mode d'excitation monophotonique ou biphotonique[344]. L'expression de la fluorescence résultant d'une excitation à deux photons peut alors s'écrire :

$$F(r, t) = \frac{1}{2} \varphi_f f N_{abs}(r, t)$$

Avec :

F : intensité de fluorescence,

N_{abs} : nombre de photons absorbés,

φ_F : rendement quantique de fluorescence,

f : facteur d'appareillage,

$\frac{1}{2}$: l'émission d'un photon est provoquée par l'absorption de deux photons.

C'est sur la base de cette équation que Xu et Webb, ont développé une méthode permettant en collectant l'émission de fluorescence via excitation laser de remonter à la valeur de la section efficace[265]. Le signal d'émission dépend de l'ensemble des conditions opératoires. On peut citer les éléments présents le long du chemin optique (miroir, lentille,...), le détecteur mais aussi la source (intensité et polarisation du rayon incident). Pour prendre en compte ces différents paramètres expérimentaux, la grandeur notée f est introduite pour tenir compte de leurs contributions. La détermination *stricto sensu* de ce paramètre n'est pas possible, un calibrage est donc nécessaire pour utiliser cette méthode, qui est donc dite « relative ». Des composés standards avec une section efficace d'absorption à deux photons connue permettent de réaliser cette

calibration. Le choix du standard doit permettre de couvrir l'ensemble de la fenêtre spectrale des échantillons mesurés, ou alternativement celle balayée par le laser utilisé comme source. L'utilisation de l'équation suivante permet, par comparaison des rapports des aires du signal de fluorescence, de remonter à la section efficace d'absorption à deux photons par la formule

$$\sigma_{ADP}(\lambda) = \frac{F}{F_r} \times \frac{\varphi_r}{\varphi} \times \frac{c_r}{c} \times \sigma_{ADP_r}(\lambda)$$

avec :

F et F_r : aires du signal de fluorescence du composé et de la référence,

c et c_r : la concentration du composé et de la référence,

φ et φ_r : rendement quantique de fluorescence du composé et de la référence,

$\sigma_{ADP}(\lambda)$ et $\sigma_{ADP_r}(\lambda)$: section efficace d'absorption à deux photons du composé et de la référence à la longueur d'onde(λ).

Comme pour la détermination d'un rendement quantique de fluorescence, si les mesures ne sont pas effectuées dans le même solvant, il faut tenir compte de leurs indices de réfraction respectifs (n et n_r) selon l'équation :

$$\sigma_{ADP}(\lambda) = \frac{F}{F_r} \times \frac{\varphi_r}{\varphi} \times \frac{c_r}{c} \times \frac{n^2}{n_r^2} \times \sigma_{ADP_r}(\lambda)$$

Le laser titane saphir en régime femtoseconde (fs) est généralement utilisé pour déterminer les sections efficaces. La gamme spectrale maximale est de 690-1050nm. Cette gamme de fréquence peut néanmoins varier en fonction de l'état du laser et du type de détecteur utilisé. Le système utilisé au laboratoire permet de réaliser ces mesures sur une gamme spectrale entre 700 et 950 nm. Avec un laser blanc et un système de monochromateur et de détecteur approprié, une large gamme spectrale, 400-2000 nm, est accessible. Il convient dans tous les cas de vérifier la dépendance quadratique de l'intensité, pour être sûr que la fluorescence est bien induite par l'absorption à deux photons. Des absorptions monophotoniques ou d'ordre supérieure comme l'absorption à l'état excité, même très peu intenses, peuvent en effet s'ajouter au phénomène voire le couvrir ce qui fausse la mesure de la section efficace.

II.1.b) Méthode de mesure de l'absorption à deux photons par la méthode Z-scan

La méthode d'absorption (Z-scan) dérive de la méthode NLT (Nonlinear transmission). La méthode NLT consiste à mesurer l'intensité lumineuse transmise ($T(I_0)$) en fonction de l'intensité

incidente(I_0). Dans le cas d'absence d'absorption linéaire, la réponse de NLT est constante. Dans le cas d'une absorption non-linéaire, la transmission est reliée à l'intensité incidente par l'équation :

$$T(I_0) = \frac{1}{1 + \alpha_2(\lambda)I_0l_0}$$

avec :

l_0 la longueur du trajet optique.

Cette équation permet de remonter à α_2 puis à σ_{TPA} (eq). Bien que simple à mettre en œuvre cette méthode NLT mène généralement à une surestimation de la section efficace d'ADP, à cause du phénomène d'absorption à l'état excité (phénomène d'ESA pour excited state absorption).

La méthode Z-scan consiste à appliquer la mesure NLT à différentes intensités en régime fs, ce qui permet de limiter le phénomène d'ESA. Ces mesures permettent de mesurer directement la partie réelle et la partie imaginaire de la polarisabilité d'ordre trois. Cette méthode permet donc de remonter à la section efficace d'absorption à deux photons, ainsi qu'à l'indice de réfraction non linéaire et ce quelle que soit la zone spectrale. On mesure la transmittance à travers un échantillon dont la position est translatée autour d'un point focal d'un laser selon l'axe z. Pour cela on utilise un diaphragme ouvert devant le détecteur afin de récupérer tous les rayons issus du laser. En corrélant la courbe obtenue avec une courbe théorique de la partie imaginaire de la polarisabilité d'ordre trois, on remonte à la valeur du coefficient d'absorption à deux photons σ_2 (Figure annexe n°2- 1). Cette méthode présente l'avantage de pouvoir déterminer le coefficient d'absorption à deux photons sur des molécules non fluorescentes.

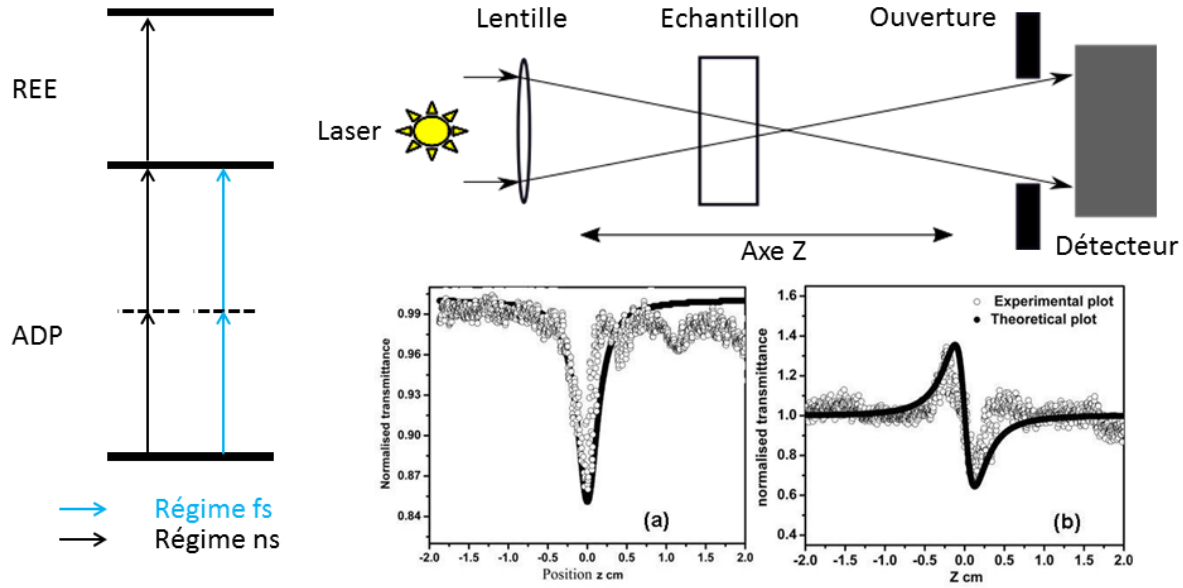


Figure annexe n°2- 1 :Principe de la méthode Z-scan : phénomène de réabsorption, schéma des conditions expérimentales et exemple de spectre obtenu.[345].

II.2) Etude de la fluorescence

L'intensité de fluorescence est une valeur strictement proportionnelle au nombre de photons absorbés, auquel elle est reliée par le rendement de fluorescence φ_f . L'expression de la fluorescence résultant d'une excitation à un photon s'écrit alors :

$$F(r, t) = \frac{1}{2} \varphi_f f N_{abs}(r, t)$$

avec :

F : intensité de fluorescence,

N_{abs} : nombre de photons absorbés,

φ_F : rendement quantique de fluorescence,

f : facteur d'appareillage,

II.2.a) La détermination absolue de φ_f

La détermination du rendement de fluorescence absolue est la plus difficile à mettre en œuvre. Elle nécessite de connaître précisément la quantité de lumière qui irradie l'échantillon. Le système est calibré par l'utilisation d'une sphère d'intégration ou d'un actinomètre et d'un agent diffusant[346]. Des méthodes calorimétriques existent également[347].

II.2.b) Détermination relativiste de φ_f :

Pour le calculer le rendement quantique par cette méthode on utilise des références dont le rendement quantique est connu en solution[346]. La référence est choisie de manière à avoir une longueur d'onde d'excitation commune avec le composé dont on souhaite trouver le rendement quantique. La double réfraction au niveau de la cuvette doit être prise en compte si les solvants d'études entre référence et échantillon sont différents. C'est cette méthode qui a été utilisé au cours de cette thèse.

La relation qui permet de relier le rendement quantique d'un composé à une référence s'écrit :

$$\varphi_s = \varphi_{réf} \left(\frac{I_{F(s)}}{I_{F(réf)}} \right) \left(\frac{\eta_s}{\eta_{réf}} \right)^2 = \Phi_{réf} \left(\frac{A_s}{A_{réf}} \right) \left(\frac{(1 - 10^{-\varepsilon lc})_{réf}}{(1 - 10^{-\varepsilon lc})_s} \right) \left(\frac{\eta_s}{\eta_{réf}} \right)^2$$

avec :

s l'échantillon et réf la référence,

φ le rendement de fluorescence,

η l'indice de réfraction du solvant,

I l'intensité de fluorescence,

A l'aire de fluorescence.

Dans le cadre de solution suffisamment diluée, il est possible de faire le lien avec la densité optique de la solution, DO, ($DO = \varepsilon.l.c$) et de linéariser l'expression $(1 - 10^{-\varepsilon lc})$. La relation suivante permet alors de remonter au rendement quantique dans le cas de solutions diluées ($DO < 0.1$) :

$$\Phi_s = \Phi_{réf} \left(\frac{A_s}{A_{réf}} \right) \left(\frac{DO_{réf}}{DO_s} \right) \left(\frac{\eta_s}{\eta_{réf}} \right)^2$$

Pour améliorer la qualité des résultats il faut donc vérifier le comportement linéaire de la relation $A=f(DO)$ (Figure annexe n°2- 2). Une fois le comportement linéaire validé dans le domaine d'étude on peut utiliser le coefficient directeur des droites et alors utiliser l'expression suivante :

$$\Phi_s = \Phi_{réf} \frac{Pente_s}{Pente_{réf}} \left(\frac{\eta_s}{\eta_{réf}} \right)^2$$

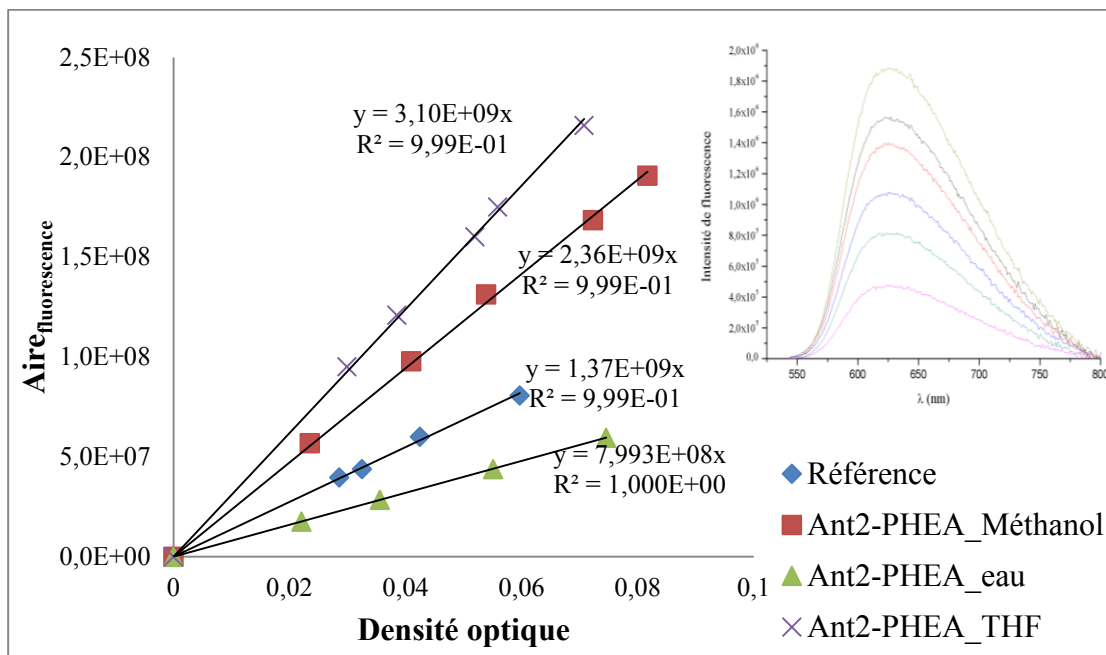


Figure annexe n°2- 2: Méthode expérimentale de mesure d'un rendement quantique de fluorescence.

Le tableau ci-dessous regroupe quelques-unes des références utilisées dans les articles de recherche[348-352].

Composés	Solvant	λ_{exe} (nm)	T (°C)	$\Phi_{\text{réf}}$
Sulfate de quinine	0,1 M HClO ₄	350	22	0,577
Fluorescéine	0,1 M NaOH	496	22	0,95 ± 0,03
9,10-DPA	cyclohexane	366	-	1,00 ± 0,05
Tryptophan	eau	280	-	0,13 ± 0,01
Tyrosine	eau	275	23	0,14 ± 0,01
Rhodamine 6G	éthanol	488	-	0,94
Rhodamine 101	éthanol	450-465	25	1,0
Cristal violet	méthanol	540-640	22	0,54
Coumarine 153	méthanol	425-500	-	0,45

Références pour détermination du rendement quantique.

De la même façon on peut définir le rendement quantique de phosphorescence comme le produit du rendement quantique de croisement intersystème et de celui d'émission radiative de l'état triplet selon l'équation suivante :

$$\phi_P = \frac{k_{CIS}}{k_r^s + k_{nr}^s} \times \frac{k_r^T}{k_r^T + k_{nr}^T} = \Phi_{CIS} \times \frac{k_r^T}{k_r^T + k_{nr}^T}$$

II.2.c) Temps de vie de fluorescence

La mesure du temps de vie de fluorescence se fait selon deux grandes méthodes : mesure time-domain ou frequency-domain. La méthode dans le domaine temporelle a été utilisée dans le cadre de cette thèse. Elle permet d'accéder aux temps de vie de fluorescence court (ns) par des mesures rapides. Bien qu'il existe de nombreuses méthodes, seule la méthode de mesure par comptage de mono-photon corrélé dans le temps TCSPC pour time-correlated single-photon counting en anglais a été utilisé[353-355]. Les conditions expérimentales utilisées pour mesurer les temps de vie de fluorescence.

II.3) Mesure du rendement quantique de génération d'oxygène singulet

Deux grandes techniques sont utilisées pour la détermination de ϕ_{Δ} [155, 356].

II.3.a) Détection de la phosphorescence

La méthode de choix est la mesure de la phosphorescence de l'oxygène singulet[357]. La bande de phosphorescence est observée entre 1235 et 1315nm, avec un maximum à 1270nm. Le signal mesuré est alors proportionnel au rendement de phosphorescence d'oxygène singulet. L'utilisation d'une référence permet comme dans le cas de la fluorescence de remonter par calibration à la valeur du rendement quantique de phosphorescence. Les mêmes conditions sont requises : travailler à longueur d'onde fixe, densité optique inférieure à 0,1 avec les mêmes conditions expérimentales. Il subsiste une différence notable, il faut tenir compte du temps de vie de $^1\Delta_g$ si l'on travaille dans un solvant différent pour rendre compte du changement de rendement quantique de luminescence (Tableau C- 1). Pour s'affranchir de ces considérations complexes, on travaille généralement dans un solvant commun pour la référence et l'ensemble des composés à analyser. Le chloroforme est le solvant usuel dans lequel le temps de vie de luminescence est le plus élevé, permettant d'obtenir le signal le plus intense (et donc le moins bruité). Il est pour cela généralement utilisé. De la même façon qu'avec la fluorescence, le tracé de la droite d'étalonnage est réalisé en utilisant l'équation :

$$\phi_{\Delta s} = \phi_{\Delta \text{réf}} \frac{\text{Pente}_s}{\text{Pente}_{\text{réf}}} \left(\frac{\tau_s}{\tau_{\text{réf}}} \right) \left(\frac{\eta_s}{\eta_{\text{réf}}} \right)^2$$

avec :

- ϕ_{Δ} le rendement quantique de génération d'oxygène singulet
- Pente_x la pente de la fonction $\text{Aire}_{\text{phosphorescence};x} = f(DO_x)$

- τ le temps de vie de l'oxygène singulet dans le solvant de l'échantillon et dans le solvant de la référence.

La phénalénone (Figure annexe n°2- 3) possède un rendement quantique de 0,95 dans tous les solvants organiques permettant de mesurer cette référence, et est donc particulièrement adapté comme composé de référence[358].

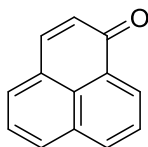


Figure annexe n°2- 3 : Structure de la phénalénone.

En raison d'une faible efficacité quantique de phosphorescence de l'oxygène cette méthode nécessite un détecteur possédant une grande sensibilité dans l'infra-rouge si l'on souhaite obtenir des mesures exploitables. De plus la génération d'oxygène singulet est très faible dans les solvants protiques (eau, alcools), notamment à cause du faible temps de vie de ce dernier. Dans de nombreux solvants cette technique ne permet pas de déterminer la production d'oxygène singulet. Cependant, cette méthode est celle choisie dans le cadre de cette thèse à cause de la qualité de ses résultats, et car les études sont réalisées dans le chloroforme.

II.3.b) Inhibiteur via-réactivité direct

Cette méthode ouvre un plus grand champ d'application.

Cette méthode est basée sur le suivi cinétique d'extinction de fluorescence d'une fluorophore sous l'effet de son oxydation par l'oxygène singulet. En présence du photosensibilisateur et sous irradiation lumineuse, l'oxygène singulet généré va réagir avec le fluorophore, conduisant à une diminution progressive de sa luminescence. En utilisant la relation suivante on peut déterminer le taux d'avancement de la réaction entre l'oxygène et l'inhibiteur : φ_{in} en suivant la consommation de l'inhibiteur[357].

$$\varphi_{in} = \frac{C_t - C_0}{\frac{DO_{photo}}{V_r} t}$$

avec :

- C_t la concentration de l'inhibiteur à l'instant t ,
- DO la densité optique absorbée par le photosensibilisateur à l'instant t ,
- V_r le volume irradié par l'échantillon.

Ce taux d'avancement permet à son tour d'accéder au rendement quantique de génération d'oxygène φ_{Δ} , à partir de l'équation :

$$\frac{1}{\varphi_{In}} = \frac{1}{\varphi_{\Delta}} + \frac{1}{\varphi_{\Delta}} \frac{k_d}{k_{O_2}} \frac{1}{C_0}$$

avec :

- k_d la constante de vitesse de désexcitation de l'oxygène avec le milieu,
- k_{O_2} la constante de vitesse de réaction inhibiteur-dioxygène.

Cette méthode est peu avantageuse, car le calcul se base sur de nombreux paramètres à la fois difficile à évaluer, et potentiellement sensible aux conditions expérimentales (V_r , k_d , k_{O_2}), rendant des mesures quantitatives sujettes à caution. Son intérêt pratique est limité aux cas où une mesure spectroscopique de génération d'oxygène singulet est impossible, en particulier lorsque l'on souhaite évaluer l'efficacité d'un photosensibilisateur en milieu aqueux. Par manque de temps, nous n'avons pu réaliser une telle évaluation au cours de ce travail de thèse.

Les références les plus utilisés sont le DPBF et le 9,10-dipropionate-anthracene de sodium. Il réagit avec l'oxygène singulet via des réactions de cycloaddition inhibant leurs propriétés de fluorescence (Figure annexe n°2- 4) [155].

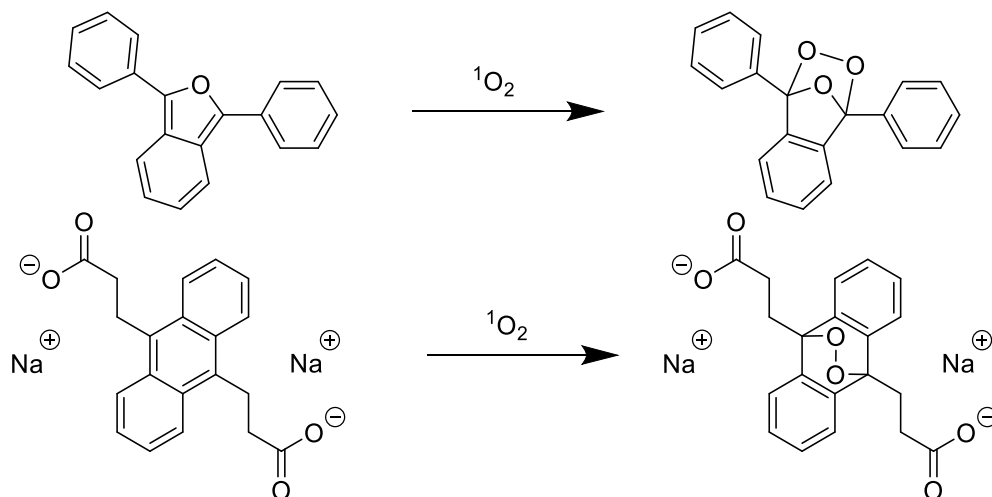


Figure annexe n°2- 4 : Exemple de chromophore permettant de remonter à φ_{Δ} .

Les techniques évoqués ici sont utilisées pour faire les analyses des photosensibilisateurs en laboratoire mais ne sont pas applicables pour les études *in-cellulo* de la génération de l'oxygène singulet notamment à cause de la nature du milieu. Ces études sont cependant nécessaires pour comprendre le mode d'action de l'oxygène singulet.

Mots clés : photothérapie dynamique, absorption à deux photons, ingénierie moléculaire, atome lourd, microscopie de fluorescence intravitale, polymère hydrosolubilisant, marqueurs, complexation ADN.

Résumé :

L'utilisation de chromophores absorbant à deux photons (ADP) pour des applications en photothérapie dynamique (PDT) et en imagerie de fluorescence présente de nombreux avantages. Les propriétés non-linéaires de ces chromophores permettent notamment d'améliorer la longueur de pénétration dans les organismes vivants ainsi que la résolution. Pour des applications *in-vivo* la biocompatibilité de ces chromophores lipophiles doit aussi se poser.

Une étude d'ingénierie pour le développement de chromophores pour la PDT-ADP en utilisant des atomes de brome comme groupe générateur d'oxygène singulet est décrite. Différents paramètres dont le nombre et la position des atomes de brome sur la chaîne carbonée, la longueur de conjugaison, la géométrie des chromophores ont été étudiés. Cette étude permet de mettre en évidence l'importance de la position des substituants bromes et de la symétrie sur le rendement de croisement inter-système.

Les observations spectroscopiques faites lors de l'étude d'ingénierie ont permis de développer des chromophores pour la microscopie de fluorescence à deux photons. La biocompatibilité est apportée grâce à un polymère d'(hydroxyethyl)acrylate. Ce polymère permet de créer une coquille hydrosolubilisante covalente. Ces chromophores ont été utilisés pour faire de l'imagerie de vascularisation cérébrale de haute résolution. Une observation particulière sur un chromophore, marquage des cellules endothéliales des parois des vaisseaux sanguins intravitaux ainsi que les applications en résultant sont présentées.

Des stratégies visant l'amélioration de la sélectivité des systèmes polymères/chromophores pour des applications intravitales, comme le traitement des tumeurs cancéreuses sont décrites. Une stratégie de modification des fonctions hydroxy des chaînes polymères par des groupements imidazoliums est présentée. L'étude de complexation des polymères avec l'ADN et les études spectroscopiques *in-cellulo* ont été réalisées.

Key words: photodynamic therapy, two-photon absorption, molecular engineering, heavy atom effect, intravital fluorescence microscopy, biocompatible polymer, markers, DNA complexation.

Abstract:

The use of two-photon absorbing (TPA) chromophore for applications in photodynamic therapy (PDT) and fluorescence imaging provides many advantages. The non-linear properties make it possible to increase both observation depth in animals and 3D resolution. Nevertheless, for *in-vivo* applications, improving bio-compatibility of these inherently lipophilic chromophore is a challenge.

The development of new chromophores for PDT-TPA using a molecular engineering approach using bromide substituents as singlet oxygen generators is described. Parameters like position and number of bromide, the conjugated length and chromophore symmetry are studied. The study shows the importance of bromide atom position and of the symmetry on the inter system crossing efficiency.

During the engineering study, spectroscopic observation and rationalization permit to envision the design of new chromophores for two photon laser scanning fluorescent microscopy. Bio-compatibility of these chromophores is provided by (hydroxyethyl)acrylate polymer, which provides a covalent water-soluble shell. These chromophores are used to make high resolution image of cerebral vascularization. One of these chromophores shows intravital specific interaction with endothelial cells in blood vessels. Some applications of the chromophore are described.

Strategies to increase the intravital selectivity of polymer/chromophores units towards cancer cells and tumor are presented. A modification of hydroxyl function by imidazolium group is described. This new chromophore is evaluated towards its complexation properties with DNA and *in cellulo* spectroscopic studies.